

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**  
**NÚCLEO DE SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**MICROPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM TOXINAS ISOLADAS DE**  
***Crotalus durissus terrificus* COMO TERAPIA EXPERIMENTAL NA LEISHMANIOSE**  
**CUTÂNEA**

PORTO VELHO/RO

2014

SHARON ROSE ARAGÃO MACEDO

**MICROPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM TOXINAS ISOLADAS DE  
*Crotalus durissus terrificus* COMO TERAPIA EXPERIMENTAL NA LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental *scripto sensu* da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Nicolete

PORTO VELHO/RO

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

B748a

Aragão-Macedo, Sharon Rose

Micropartículas Biodegradáveis funcionalizadas com toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus* como terapia experimental na Leishmaniose Cutânea./ Sharon Rose Aragão Macedo, 2014. 66f. : il.

Orientador: Dr. Roberto Nicolete

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11- 549

SHARON ROSE ARAGÃO MACEDO

MICROPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM TOXINAS ISOLADAS DE *Crotalus durissus terrificus* COMO TERAPIA EXPERIMENTAL NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Banca examinadora:

---

Dr. Roberto Nicolete  
(Pesquisador Fiocruz Rondônia)

---

Dra. Monika Piazzon Tagliari  
(Professora FIMCA)

---

Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes  
(Pesquisadora Fiocruz Rondônia)

*A Deus que me deu vida e capacidade de realizar esse trabalho. Aos meus pais Marcos e Marlúcia que sempre me mostraram o caminho certo a seguir. Aos meus irmãos Enoch Silas e Queren Hoppe que sempre torceram por mim. E ao meu amado esposo Uanderson que nos momentos difíceis esteve ao meu lado, enxugou minhas lágrimas e me fez sorrir.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Deus, pois, Ele é digno de toda honra e toda glória.

Ao meu orientador, Professor Dr. Roberto Nicolete pela oportunidade, confiança e companheirismo.

Ao professor Dr. Andreimar Soares, por fornecer as proteínas utilizadas nesse trabalho.

A minha amiga e companheira Neuza, por sempre estar ao meu lado compartilhando a bancada e as experiências vividas.

À Dra Giselle Gonçalves, pela amizade, companheirismo e muitas risadas.

Ao meu amigo Norton Pejara, por me acompanhar em vários imunoenaios e pela amizade.

À Amália, Larissa e Fernando que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

Ao laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, no qual esse trabalho foi desenvolvido.

Aos laboratórios da Fiocruz – Rondônia, que sempre que necessário prestaram apoio e me auxiliaram.

Ao Centro de Biomoléculas Aplicadas à Saúde – CEBio, pelo apoio técnico.

À CAPES, CNPq e Fiocruz pelo fomento e apoio à Pesquisa.

## RESUMO

As leishmanioses encontram-se entre as doenças infectoparasitárias de maior incidência no mundo. Causada por protozoários do gênero *Leishmania spp.*, essa doença acomete mais de 12 milhões de pessoas em 88 países, com cerca de 350 milhões sob o risco de adoecer. As drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas é suficientemente eficaz. Vários trabalhos têm descrito venenos de serpentes, bem como, suas toxinas como compostos com potencial atividade antiparasitária. Neste contexto, a produção de protótipos de fármacos abordando a micro ou nanotecnologia é uma alternativa promissora, visto que diferentes moléculas podem ser direcionadas para a célula alvo contendo o protozoário. O objetivo desse trabalho foi encapsular toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus* em micropartículas poliméricas biodegradáveis, constituídas pelo Ácido Poli Lático co-Glicólico (PLGA) e avaliar sua atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*. Análises de interação molecular entre as proteínas de *L. amazonensis* e as toxinas crotamina e crotoxina foram realizadas por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS). As micropartículas produzidas foram caracterizadas *in vitro*, através da análise dos diâmetros, Potencial Zeta, taxa de encapsulação e morfologia. A viabilidade das promastigotas expostas às toxinas encapsuladas e em solução foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT. O ensaio de toxicidade de macrófagos murinos incubados com as micropartículas foi realizado pelo método colorimétrico de MTT. Além disso, foi determinado o índice fagocítico de macrófagos peritoneais incubados com micropartículas e o sobrenadante celular foi coletado para dosagem da citocina TNF- $\alpha$ . Também foi realizado um ensaio de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados de interação mostraram que a crotamina apresentou uma elevada afinidade e/ou interação com as proteínas presentes no extrato bruto de leishmania. Os diâmetros e potencial zeta das partículas controle e contendo crotamina foram (1,3  $\mu\text{m}$  e -12,3 mV) e (3,0  $\mu\text{m}$  e -20,9 mV), respectivamente. As micropartículas contendo crotamina apresentaram efeitos similares (em torno de 18% de inibição) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 24 e 48 horas de incubação. As partículas controle e contendo crotamina apresentaram toxicidade inferior a 5% em macrófagos peritoneais. O ensaio de fagocitose de micropartículas por macrófagos peritoneais mostrou que a quantidade de micropartículas contendo crotamina que foram capturadas foi superior a de micropartículas controle. Os maiores níveis de TNF- $\alpha$  detectados foram obtidos quando os macrófagos foram incubados com micropartículas contendo crotamina e também crotamina em solução. Macrófagos que capturaram micropartículas contendo crotamina apresentaram menor Índice Fagocítico quando comparados com os macrófagos apenas infectados. A aplicação desta tecnologia no modelo de infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, envolvendo a liberação intracelular de uma toxina revelou-se segura e inovadora para o desenvolvimento de terapias alternativas/complementares contra a leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, *Crotalus durissus terrificus*, Crotamina, Crotoxina, Micropartículas biodegradáveis, Terapia

## ABSTRACT

Leishmaniasis are among the highest incidence of infectious and parasitic diseases in the world caused by protozoa of the genus *Leishmania spp.* This disease affects more than 12 million people in 85 countries with 350 million at risk of becoming ill. The drugs available for the treatment of leishmaniasis show high toxicity and none of them is sufficiently effective. Various studies have described snake venoms, as well as their toxins as compounds with potential antiparasitic activity. In this context, the production of prototype drugs addressing micro and nanotechnology is a promising alternative, since different molecules can be directed to the target cell containing the protozoa. The aim of this study was to encapsulate toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* into biodegradable polymeric microparticles, formed by Acid Poly Lactic co- glycolic (PLGA) and evaluate their *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*. The analysis of proteic interaction between *L. amazonensis* extract and toxins (crotamine and crotoxin) was performed by Surface Plasmon Resonance (SPR) technique. After this analysis, the microparticles produced were *in vitro* characterized, by analysing their diameters, Zeta Potential, encapsulation efficiency and morphology. The viability of promastigotes exposed to toxins encapsulated and in solution form was evaluated by colorimetric MTT assay. The toxicity test employing the microparticles was performed in murine macrophages by the MTT colorimetric method. Furthermore, phagocytic index was determined in peritoneal macrophages incubated with microparticles and the supernatant was collected for cytokine assay. We also conducted *in vitro* infection of peritoneal macrophages with promastigotes of *L. amazonensis* incubated with the microparticles. The results achieved showed that crotamine presented high affinity and/or interaction with the proteins present in the crude extract of leishmania. The diameters and zeta potential of control and encapsulated crotamine were (1.3  $\mu\text{m}$  and -12.3 mV) and (3.0  $\mu\text{m}$  and -20.9 mV), respectively. Microparticles containing crotamine had similar inhibitory effect (about 18%) against promastigotes of *L. amazonensis*, both at 24 and 48 hs. The particles containing crotamine and also control ones showed low toxicity (5%) against peritoneal macrophages. The amount of microparticles containing crotamine was higher than control microparticles during phagocytosis assay. The highest levels of TNF- $\alpha$  detected were obtained from macrophages incubated with microparticles containing crotamine and also its solution form. Macrophages that engulfed microparticles containing crotamine presented lower phagocytic index compared to infected control macrophages. The employment of this technology at the infection model assessed, regarding the intracellular release of toxins, showed safety and has potential for the development of promising new alternative/complementary therapies against cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, *Crotalus durissus terrificus*, Crotamine, Crotoxin, Biodegradable microparticles, Therapy



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i> ....	
<b>Figura 2.</b> Atividade antileishmania do veneno de <i>C.d.terrificus</i> .....	
<b>Figura 3.</b> Atividade antileishmania da crotamina em solução.....	35
<b>Figura 4.</b> Atividade antileishmania da crotoxina em solução.....	36
<b>Figura 5.</b> Interação molecular da crotamina e crotoxina com extrato bruto proteico das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> Interação molecular da crotamina e crotoxina com micropartículas compostas de PLGA.....	38
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos diâmetros médios obtidos para as micropartículas controle e micropartículas contendo crotamina.....	40
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia eletrônica das micropartículas contendo a crotamina.....	41
<b>Figura 9.</b> Avaliação da atividade antileishmania da crotamina em solução e encapsulada após 24 horas de incubação.....	42
<b>Figura 10.</b> Avaliação da atividade antileishmania da crotamina em solução e encapsulada após 48 horas de incubação.....	43
<b>Figura 11.</b> Avaliação da toxicidade de crotamina em solução e encapsulada contra macrófagos peritoneais murinos.....	44
<b>Figura 12.</b> Ensaio de captura de micropartículas por macrófagos peritoneais.....	45
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias representativas do ensaio de captura das micropartículas pelos macrófagosperitoneais.....	46
<b>Figura 14.</b> Quantificação de TNF- $\alpha$ no sobrenadante do ensaio de captura das micropartículas pelos macrófagos peritoneais .....	47
<b>Figura15.</b> Avaliação da atividade de crotamina encapsulada e em solução sobre as formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 24 horas .....	49
<b>Figura16.</b> Fotomicrografias representativas de macrófagos peritoneais infectados experimentalmente com <i>L.amazonensis</i> e incubados com crotamina encapsulada e em solução.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Amfotericina B
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Soro Bovina
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Ctm	Crotamina
Ctx	Crotoxina
GTP	Guanosina Trifosfato
IC	Inibição de Crescimento
IF	Índice Fagocítico
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
J774	Linhagem específica de macrófagos
LAO	L-Aminoacido-Oxidase
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MP	Micropartículas polimérica
MTT	<i>3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NMG	N-metilglucamina
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PHBV	Poli 3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato
PLA2	Fosfolipase A <sub>2</sub>

PLGA	Poli Acido Láctico-Glicólico
PPG	Proteofosfoglicano
PVA	Álcool Polivinílico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPS	Ressonância Plasmônica de Superfície
SBF	Soro Fetal Bovino
SDS	Dodecil Dissulfato de Sódio
SGS	Estibogluconato de sódio
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
TCD4+	Células T CD4 ativadas
TCD8+	Células T CD8 ativadas
TDR	Tripanotiona Redutase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Leishmaniose tegumentar americana e a resposta imune do hospedeiro	13
1.2 Quimioterapia e uso de toxinas animais como alternativa terapêutica para a LTA	16
1.3 Sistemas de liberação modificada de fármacos	20
<b>2 OBJETIVO</b>	23
<b>3 METODOLOGIA</b>	25
3.1 Isolamento e Caracterização Bioquímica das toxinas de <i>C.d.terrificus</i>	24
3.2 Análise de interação molecular pela técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS)	24
3.3 Obtenção e Cultivo de <i>Leishmania amazonensis</i>	25
3.3.1 Parasitas	25
3.3.2 Cultivo do parasita	25
3.4 Ação do veneno e das toxinas em solução sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26
3.5 Encapsulação em sistema polimérico microparticulado	26
3.6 Caracterização <i>in vitro</i> das partículas	27
3.7 Animais	27
3.8 Obtenção de macrófagos peritoneais	28
3.9 Ensaio de toxicidade celular	28
3.10 Ensaio de captura de partículas	29
3.11 Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29
3.12 Quantificação da citocina TNF- $\alpha$ no sobrenadante celular	30
3.13 Análise estatística dos dados	31
<b>4 RESULTADOS</b>	33
4.1 Parte I: Estudos envolvendo a atividade antileishmania de crotamina e crotoxina	32
4.1.1 Avaliação da atividade antileishmania do veneno de <i>C.d.terrificus</i>	33
4.1.2 Avaliação da atividade antileishmania da crotamina	34

4.1.3 Avaliação da atividade antileishmania de crotoxina.....	35
4.1.4 Análise da interação molecular por RPS.....	36
<b>4.2 Parte II: Estudos envolvendo a liberação modificada de crotamina e atividade antileishmania.....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Avaliação Taxa de encapsulação de crotamina.....	39
4.2.2 Análise dos diâmetros das partículas.....	39
4.2.3 Análise da morfologia das partículas.....	40
4.2.4 Análise do Potencial Zeta.....	40
4.2.5 Atividade da crotamina em solução e encapsulada contra <i>L. amazonensis</i> .....	41
4.2.6 Avaliação da toxicidade crotamina em solução e encapsulada frente macrófagos murinos.....	43
4.2.7 Avaliação da captura de partículas pelos macrófagos murinos.....	44
4.2.8 Níveis de TNF- $\alpha$ produzidos por macrófagos peritoneais após incubação com as micropartículas.....	46
4.2.9 Avaliação da atividade das micropartículas contendo crotamina sobre o crescimento/sobrevivência das formas amastigotas.....	47
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A. Protocolo de aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO B. Apresentação de trabalho no I Encontro de Estudantes de Pós-graduação em Saúde.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO C. Apresentação de trabalho no <i>Fifth World Congress on Leishmaniasis</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO D. Apresentação de trabalho no <i>XVIII International Congress for tropical Medicine and Malária and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO E. Apresentação de trabalho no I Simpósio de Bionanotecnologia de Rondônia e II Encontro dos Estudantes de Pós-graduação em Saúde.....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

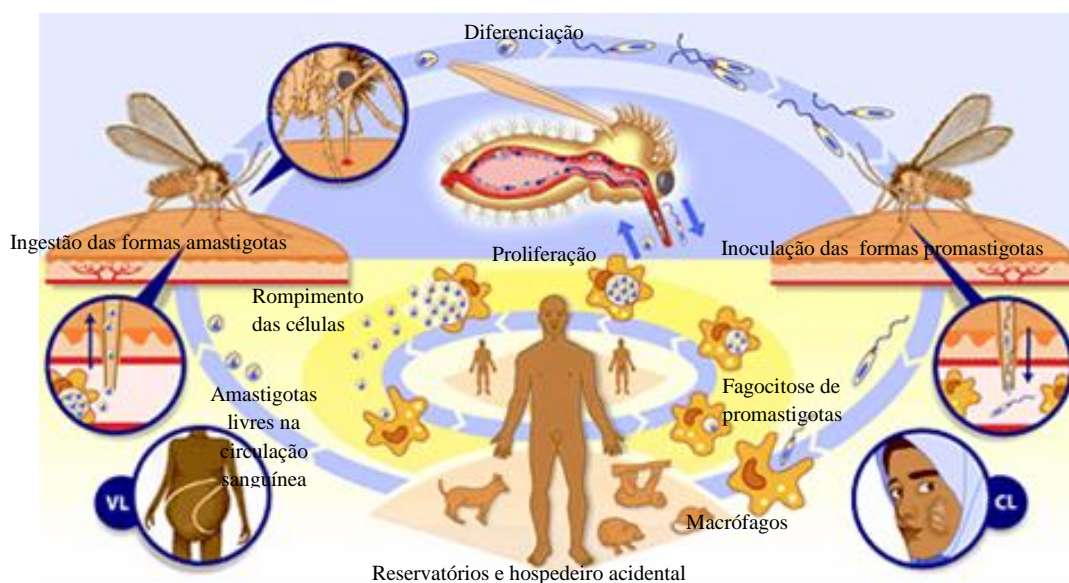
As leishmanioses encontram-se entre as doenças infectoparasitárias de maior incidência no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 12 milhões de pessoas encontram-se doentes em 88 países. Além disso, 350 milhões de pessoas estão sob o risco de adoecer. No mundo, são notificados 2 milhões de novos casos ao ano e no Brasil 3 mil casos são registrados anualmente (WHO, 2013). Transmitida ao hospedeiro vertebrado pela picada de um flebotomíneo infectado e causada por protozoários do gênero *Leishmania spp*, as leishmanioses são manifestadas na forma cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA) e visceral (Leishmaniose Visceral – LV). Representam uma doença complexa com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo classificada como uma doença negligenciada e um problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2010; BRASIL, 2007).

### 1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E A RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

A LTA é uma doença infecciosa não contagiosa que acomete as estruturas da pele e cartilagem da nasofaringe de forma localizada ou difusa causada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. É uma doença zoonótica, afetando animais silvestres e acidentalmente envolvendo o homem (BRASIL, 2007). Atualmente, existem 7 espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LTA no Brasil, uma do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*, estas são: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi*. Esses parasitas apresentam-se nas formas amastigota (arredondada, aflagelada e intracelular) nos hospedeiros vertebrados e promastigota (alongada e flagelada) nos vetores invertebrados (BRASIL, 2010). Os vetores constituem um grupo de insetos hematófagos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo). Ao se alimentarem, os vetores sugam o sangue de um animal infectado contendo as formas amastigotas, que se alojam em seu intestino e se transformam em promastigotas. No sistema digestório dos vetores, as promastigotas se multiplicam por aparente divisão simples e assexuada e migram para a probóscide do inseto onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas (BASANO e

CAMARGO, 2004; DEDET, 2008). As formas promastigotas podem ser inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo e infectam células do Sistema Mononuclear Fagocítico, alojando-se principalmente em fagossomos de macrófagos onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos (BASANO e CAMARGO, 2004) (Figura 1).

**Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.**



**Fonte: Adaptado de Santos, et al., 2008**

A infecção por *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* geralmente pode levar a diversas manifestações clínicas como: cutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa, essa última é uma manifestação rara, grave e difícil de ser controlada com a quimioterapia convencional (SOONG, 2012; BRASIL, 2010). As manifestações clínicas observadas na infecção por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, são descritas como lesões localizadas, disseminadas e o grave comprometimento da mucosa nasal (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; BRASIL, 2010). A forma mucocutânea também é decorrente da infecção por *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* e envolve uma forte resposta inflamatória e disseminação parasitária a partir de uma lesão cutânea primária única ou múltipla (RONET, et al., 2011; BRASIL, 2010). Mais recentemente, as espécies *Leishmania* (*V.*) *lainsoni*, *Leishmania* (*V.*) *naiffi*, *Leishmania* (*V.*) *lindenberge* e *Leishmania* (*V.*) *shawii* foram descritas em estados das regiões Norte e Nordeste, causando lesões cutâneas (THIEL et al., 2010; PASSERO et al., 2012; BRASIL, 2010).

O sucesso na infecção por *Leishmania sp* pode ser atribuído aos mecanismos de escape que as formas promastigota e amastigota desenvolveram para se evadir do Sistema Imunológico do hospedeiro. Esses mecanismos levam à cronicidade da infecção pelo desenvolvimento de uma resposta de perfil Th2 que confere suscetibilidade do hospedeiro ao parasita (ROMÃO et al., 2007).

Estes mecanismos podem ser classificados como extra e intracelular, de forma que, após o repasto sanguíneo o parasita recém inoculado no hospedeiro inicia a ação dos mecanismos de evasão extracelular, que se dão pela inibição do Sistema Complemento. Essa inibição se dá principalmente por meio da gp63, uma glicoproteína de superfície do parasita, que cliva a molécula C3b em C3bi inativando-a e pelo impedimento (por meio da molécula Lipofosfoglicano - LPG) da formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) na superfície do parasita (ROMÃO et al., 2007). Ao escaparem da ação da lise mediada por este complexo, as promastigotas são fagocitadas por meio da interação com receptores que reconhecem padrões moleculares desses parasitas, como os receptores tipo toll (*Toll like Receptors*), os receptores para fucose-manose, os receptores para fibronectina, dentre outros (NADERER;MCCONVILLE, 2008).

Ao estabelecerem a infecção, as formas amastigotas iniciam o desenvolvimento dos mecanismos de evasão intracelular (CASTELLANO, 2005). Durante a fase inicial da infecção intracelular, o Lipofosfoglicano (LPG), molécula de superfície do parasita supostamente inibe a maturação e fusão do fagossomo com o lisossomo e a proteína gp63 possivelmente inativa as enzimas do lisossomo, caso a fusão ocorra. A forma amastigota possui enzimas como a catalase e a superóxido dismutase em grandes concentrações, o que a protege da explosão oxidativa dos macrófagos. O parasita intracelular também possui um sistema antioxidante baseado em tripanotona, responsável pela defesa contra oxidantes, metais pesados e xenobióticos e espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio (CASTELLANO, 2005; ROMÃO et al., 2007).

Além disso, as infecções por *Leishmania spp.* estão relacionadas com a capacidade dos linfócitos se diferenciarem em células TCD4+ ou TCD8+. As células TCD4+ ativam os macrófagos, aumentando a capacidade microbicida e também ativam os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos específicos, além da ativação de células capazes de produzir citocinas, que são importantes para o desenvolvimento, controle e proteção do sistema imune do hospedeiro (ROGERS et al., 2002; HOLZMULLER et al., 2006; ANTONELLI et al., 2004).



Na relação parasito-hospedeiro, observam-se duas subpopulações de células TCD4<sup>+</sup> na resposta adaptativa: Linfócitos T CD4<sup>+</sup> do padrão de resposta Th1 e do padrão Th2. A resposta adaptativa que envolve linfócitos do tipo Th1 é necessária para o controle da infecção e caracteriza-se pelo envolvimento de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e citocinas como interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e algumas quimiocinas produzidas por macrófagos. Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$ , tornando-os capazes de eliminar de maneira mais eficiente o parasito, resultando na síntese de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio e, consequentemente, na morte dos parasitos intracelulares, controlando a infecção. Quando a resposta do hospedeiro leva à ativação de linfócitos do tipo Th2 CD4<sup>+</sup>, há o agravamento da doença pela produção de citocinas como a interleucina-10 (IL-10) que desativa os macrófagos inibindo a produção de citocina e os mecanismos microbicidas (CUNNINGHAM, 2002; BOGDAN et al., 1996; BOGDAN;ROLLINGHOFF, 1999; AWASTHI et al., 2004; ABBAS et al., 2008).

## 1.2 QUIMIOTERAPIA E USO DE TOXINAS ANIMAIS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A LTA

Durante décadas, o tratamento de primeira escolha da leishmaniose cutânea tem se restringido ao uso de antimoniais, entretanto, esses compostos são altamente tóxicos e apresentam diversos efeitos colaterais. Os fármacos anfotericina B e pentamidina, são as drogas de segunda e terceira escolha, respectivamente, e têm sido utilizados quando há contra-indicações, intolerância ou resistência do parasita aos antimoniais (FILHO et al., 2008; ALMEIDA;SANTOS, 2011).

O antimonial estibogluconato de sódio trivalente (Sb<sup>+3</sup>), tártaro emético, foi introduzido no Brasil por Gaspar Vianna em 1912. Sob a forma de antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>), são as drogas de primeira escolha desde 1945 para o tratamento das leishmanioses. Há comercialmente o antimoniato de N-metilglucamina (NMG) (Glucantime®), na América Latina e África e o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam®), nos EUA e Europa. O tratamento consiste na administração endovenosa de 15 a 20mg/Sb<sup>+5</sup>/kg/dia durante 20 dias para a forma cutânea e 30 dias para a forma mucosa (ALMEIDA;SANTOS, 2011; LAWN, 2003). Acredita-se que o mecanismo de ação dos antimoniais seja a inibição de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP), através da inibição do ciclo do ácido cítrico e

da glicólise e a ativação e conversão do antimonial para a forma trivalente ( $\text{Sb}^{+3}$ ). Além disso, parece que o Sb é capaz de alterar o potencial redox tiol da célula, induzindo o efluxo de tiol intracelular e inibindo a tripanotona redutase (TDR1), uma enzima específica do parasito (LIMA et al., 2007).

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de N-metilglucamina é rapidamente absorvido e cerca de 90% do mesmo é excretado pelos rins nas primeiras 48 h. Logo, é necessária administração de elevadas doses do fármaco, em regime contínuo, para garantir elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Consequentemente, efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios, mialgia, náusea, vômito, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, choque séptico, edema, pancreatite e outros têm sido observados (RATH et al., 2003; LIMA et al., 2007).

Quando há falha terapêutica dos antimoniais ou em áreas endêmicas onde a resistência aos antimoniais é comum, a anfotericina B (AmB) é a droga de escolha. Como antifúngico polieno amplamente utilizado para tratar infecções fúngicas sistêmicas, a AmB apresenta alta afinidade pelo ergosterol, o esteroide predominante em células fúngicas e na membrana de *Leishmania*. Ao interagir com o ergosterol da membrana da *Leishmania*, a AmB induz formação de poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando lise celular (SINGH et al., 2012).

Os portadores da LTA são tratados com doses que podem variar de acordo com a formulação de AmB a ser utilizada. As doses podem ser de 1 a 4mg/kg diariamente e por via de administração endovenosa. A anfotericina B é efetiva na leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LM). Seu uso, porém, é limitado pelos efeitos adversos, como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos doentes (BRASIL, 2010; LIMA et al., 2007).

Esses efeitos colaterais resultantes da toxicidade de AmB foram contornados por três formulações clínicas: AmB lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de AmB (ABCD: Amphocil) e complexo lipídico de AmB (ABL: Abelcit®). Estas formulações lipídicas de AmB retraem sua atividade antifúngica e apresentam alta eficácia na cura da doença. A AmB lipossomal é incorporada pelo macrófago e praticamente não reage com o colesterol das células do hospedeiro, aumentando a eficácia e tolerabilidade da droga. Além disso, o L-AmB tem o melhor perfil de segurança e é aprovado pela FDA (do inglês “Food

*and Drug Administration*”), porém o custo limita o seu uso (SINGH et al., 2012; LIMA et al., 2007).

A pentamidina é a droga de terceira escolha e sua eficácia é bem menos conhecida. A pentamidina parece ter sido empregada pela primeira vez para tratamento da leishmaniose na forma visceral, em 1940, por Kirt e MacDonald. Quanto ao seu mecanismo de ação, sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto (PAULA et al., 2003; ALMEIDA;SANTOS, 2011).

Há dois sais de pentamidina, o isotionato de pentamidina, disponível nos EUA e Europa, e o mesilato de pentamidina, disponível apenas na Europa (Lomidine®); essas variações de pentamidina diferem entre si quanto à dose e efeito diabetogênico. Poucos estudos foram realizados nas Américas utilizando a pentamidina como terapêutica da LTA, contudo, a dose classicamente recomendada é de 4mg/kg/dia, por via de administração intramuscular profunda, alternadamente a cada dois dias, durante três meses, não devendo ultrapassar a dose total de 2 g/Kg/dia (PAULA et al., 2003; ALMEIDA;SANTOS, 2011).

Os efeitos colaterais implicados à pentamidina são divididos em imediatos e tardios. Os efeitos imediatos incluem hipotensão, náuseas, vômitos, dentre outros. Os efeitos tardios descritos são sistêmicos, e estão relacionados, por exemplo, ao metabolismo da glicose, tais como hipoglicemia (8% dos casos) e o efeito diabetogênico (5% dos casos), a alteração mais frequente, entretanto, é a renal podendo chegar a 23% dos casos. Logo, as drogas alternativas aos antimoniais também apresentam toxicidade, podem não curar e manifestar resistência (PAULA et al., 2003; LIMA et al., 2007 ).

Outros medicamentos como miltefosine, paromicina, sitamaquina, alopurinol, azitromicina, imidazóis (cetoconazol, itraconazol e fluconazol), e associações destes com os medicamentos convencionais, bem como, termoterapia e crioterapia têm sido utilizados/testados em pacientes com LTA e LV, alternativa e experimentalmente ao tratamento convencional. Entretanto, fatores como toxicidade e resistência também inviabilizam o uso terapêutico desses compostos (LIMA et al., 2007; SINGH et al., 2012; ALMEIDA;SANTOS, 2011; PAULA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2009; FILHO et al., 2008; DORLO et al., 2012).

Por estas razões, a quimioterapia da leishmaniose tem sido objeto de estudo de vários laboratórios de pesquisa, os quais analisam venenos de animais, extratos de plantas, dentre

outras biomoléculas, com a finalidade de se encontrar novos agentes antileishmania com menos efeitos colaterais e boa biodisponibilidade (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Vários estudos têm obtido sucesso com a utilização de venenos animais, bem como, suas toxinas purificadas contra *Leishmania*. Borges e colaboradores (2006) demonstraram o efeito antileishmania do veneno do escorpião *Tityus discrepans*, que induziu várias modificações estruturais em promastigotas de *Leishmania (L.) mexicana*. Fernandez-Gomez e colaboradores (1994) observaram o efeito do veneno da serpente *Cerastes cerastes*, popularmente conhecida como cascavel-de-chifres, sobre as taxas de crescimento do *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani*. Os venenos produzidos pelas diferentes espécies de serpentes brasileiras apresentam uma grande variabilidade de grupos de proteínas na sua composição e diferentes efeitos biológicos, o que os torna, fonte de investigação de compostos em potencial como alternativa terapêutica à quimioterapia da leishmaniose (PASSERO et al., 2007; RANGEL-SANTOS, et al., 2004).

*Crotalus* são serpentes popularmente conhecidas como cascavel sul-americana. São encontradas em regiões áridas e rochosas, de vegetação rasteira, sendo raramente encontrados na floresta. *Crotalus durissus* apresenta três subespécies denominadas *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, distinguidas entre si principalmente por sua coloração e distribuição geográfica (RANGEL-SANTOS et al., 2004).

O veneno de *Crotalus durissus sp* é composto por uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, que contém: toxinas, enzimas e peptídeos (BERCOVICI et al., 1987). A crotoxina (CTX) é uma neuro e miotoxina, que representa 56,3% da composição do veneno de *C.d.terrificus* (PASSERO, et al., 2007). Essa toxina é responsável pelo bloqueio da transmissão neuromuscular, efeito miotóxico, letalidade e causa os efeitos agudos no acidente ofídico (BON et al., 1989; GOPALAK-RISHNAKONE et al., 1984).

Além disso, a CTX é composta por uma subunidade básica (CB) que é uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e uma subunidade ácida (CA) denominada crotapotina, desprovida de atividades tóxicas e enzimáticas (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; BREITHAUPT et al., 1974; BREITHAUPT, 1976b). Acredita-se que a crotapotina se comporta como um transportador para a subunidade B, reduzindo a sua interação não-específica e, consequentemente, aumentando sua ligação com o alvo, conduzindo a uma maior toxicidade da CTX (RÜBSAMEN et al., 1971; BON ; JANG, 1979).

A crotamina (CTM) é um polipeptídeo altamente básico composto por 42 resíduos de aminoácidos e representa 21,7 % da composição do veneno de *C.d.terrificus* (PASSERO et

al., 2007). Essa toxina foi isolada e purificada há mais de 50 anos, desde então, surgiram muitos trabalhos, que muito contribuíram para a compreensão da crotamina frente suas propriedades estruturais, genéticas, moleculares e seus efeitos farmacológicos e terapêuticos (PEREIRA, 2011).

A crotamina é uma toxina miotóxica e seus mecanismos de miotoxicidade têm sido desvendados, por estudos eletrofisiológicos e bioquímicos realizados em culturas de células musculares. Tem sido demonstrado que esta toxina pode causar redução do potencial de membrana em repouso e aumento da condutividade da membrana por meio de um mecanismo mediado por canais de  $\text{Na}^+$  (HONG; CHANG, 1985; BRAZIL; FONTANA, 1993).

O tamanho da crotamina, sua sequência primária e sua carga positiva, têm levado alguns pesquisadores a investigar sua atividade de penetração nas células. Utilizando-a em concentrações não tóxicas para a célula (B16-F10 melanoma), estes estudos concluem que a crotamina pertence a um grupo natural de peptídeos de penetração de células (CPPs, do inglês “*cell-penetrating peptides*”), que são altamente catiônicos e de baixo peso molecular. Além disso, também foi investigado em outro estudo que crotamina induz um efeito analgésico quando comparados com a morfina (KERKIS et al., 2004; KERKIS et al., 2006).

Há anos, vários trabalhos têm descrito venenos de serpentes, bem como, suas toxinas como compostos com potencial atividade antiparasitária, podendo inibir bactérias, fungos e parasitas, tais como *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* (BORGES et al., 2006; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 1994, QUINTANA, 2012). Este cenário reforça a importância desse trabalho, visto que a utilização de micropartículas biodegradáveis como carreador de toxinas, podem otimizar o efeito antileishmania dessas toxinas, bem como reverter a citotoxicidade.

### 1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

A tecnologia de liberação modificada e/ou controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (AZEVEDO, 2002)

A administração convencional de drogas (utilizando comprimidos, cápsulas, injeções, etc.), bem como a questão da solubilidade limitada de muitas drogas disponíveis no mercado

trazem desvantagens à manutenção de um regime terapêutico eficaz. Outros protocolos terapêuticos requerem a administração de repetidas doses para se manter uma concentração adequada da droga na corrente sanguínea e proporcionar ação terapêutica por longos períodos de tempo. As concentrações elevadas da droga no sangue e as múltiplas administrações de doses do medicamento podem levar a flutuações significativas da droga na corrente sanguínea, atingindo parâmetros toxicológicos e gerando reações adversas para os pacientes (VILOS;VELASQUEZ, 2012).

Todas estas desvantagens têm levado ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos colaterais para o paciente. O avanço da ciência na biotecnologia farmacêutica tem permitido a criação de várias estratégias de sistemas de liberação modificada/controlada de fármacos, como lipossomas, hidrogéis, micro e nanopartículas poliméricas, entre outros. Os principais objetivos desses dispositivos de administração de medicamentos são a geração de uma liberação prolongada e sustentada do fármaco ao longo do tempo; uma redução da quantidade de doses necessárias para o tratamento de doenças e a proteção da inativação das drogas antes de atingir o alvo (VILOS;VELASQUEZ, 2012).

As micropartículas poliméricas (MPs) utilizadas como estratégia de entrega de drogas têm vantagens sobre os outros sistemas, visto que demonstram maior estabilidade no ambiente biológico do que os lipossomas e seus métodos de preparo fornecem suporte para encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, o que amplia significativamente suas aplicações terapêuticas. Os sistemas de entrega de drogas têm sido desenvolvidos utilizando polímeros naturais e sintéticos. Os polímeros naturais incluem quitosana, alginato de dextrano, gelatina e albumina. Os polímeros sintéticos compreendem o ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), o poli 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), o poli anidrido do ácido sebácico, entre outros (VILOS;VELASQUEZ, 2012; KOLOTOVA, et al., 2012).

As micro ou nanopartículas biodegradáveis produzidas a partir de PLGA têm recentemente atraído a atenção devido à sua biocompatibilidade clinicamente comprovada. Essas partículas protegem potencialmente diferentes moléculas, tais como ácidos nucleicos, peptídeos e antígenos proteicos, aumentando a eficiência de entrega. As micro ou nanopartículas poliméricas são capazes de apresentar antígenos e ativar as respostas humoral e celular. Muitos estudos têm discutido o tamanho ideal dessas partículas, bem como, sua contribuição para geração da resposta inflamatória (NICOLETE, et al., 2011).

Como descrito anteriormente, as formas amastigotas de *Leishmania sp* residem no interior de células do SMF, preferencialmente macrófagos. Sua localização é responsável por prejudicar a adesão e a eficácia de drogas terapêuticas. Os sistemas de entrega de drogas permitem que os efeitos adversos causados por rotas problemáticas da administração sejam evitados de forma que a atividade antileishmania seja aumentada e a toxicidade do medicamento seja reduzida. O único medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose e produzido a partir de sistemas de entrega de drogas é o AmBisome® (amfotericina B lipossomal). Esse fármaco é bastante eficaz, contudo, a via de administração é parenteral e a utilização desse medicamento se restringe ao tratamento da Leishmaniose Visceral (ROMERO;MORILLA, 2008).

Nesse contexto, a bioprospecção envolvendo venenos de serpentes, bem como, suas toxinas, pode originar protótipos antileishmania promissores. Estes podem ter seus efeitos potencializados com a encapsulação em partículas compostas de PLGA. Dessa forma, promove-se uma alternativa promissora para o tratamento alternativo/complementar da leishmaniose cutânea, pois o carregamento de drogas, além de potencializar o efeito antileishmania, pode direcionar as partículas à célula alvo, reverter a citotoxicidade, proteger o fármaco ou biomolécula da atividade catalítica de enzimas, modulando a resposta imunológica celular do hospedeiro.

## **2. OBJETIVO**

Desenvolver micropartículas biodegradáveis poliméricas funcionalizadas com a crotamina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, visando o desenvolvimento de protótipos para terapias inovadoras no tratamento alternativo ou complementar da leishmaniose tegumentar americana.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Isolamento e caracterização bioquímica das toxinas de *C.d.terrificus*

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio). O CEBio possui licença para trabalhar com toxinas animais, cujo número é 010627/2011-1 aprovada no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN). Inicialmente, foram realizadas três cromatografias por exclusão molecular em pH's e tampões diferentes. O veneno de *C.d.terrificus* foi obtido do serpentário Bioagents. Cerca de 35 mg do mesmo foi fracionado em uma coluna (60 x 1 cm) de filtração em gel (Superdex 75 ou Sephadex G-75), previamente equilibrada com (1): tampão bicarbonato de amônio 200 mM, pH 8,0; (2): tampão acetato de amônio 100 mM, pH 4,5; (3): tampão formiato de amônio (NH<sub>4</sub>Fo) 100 mM pH 3,5 (MANCIN et al., 1998). O monitoramento de todas as frações eluentes foram realizados em absorbância em 280 nm em sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, *GE Healthcare*). O monitoramento do grau de pureza foi realizado em eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS) a 13,5 % (m/v), segundo a técnica descrita por Laemmli (1970) para a determinação de peso molecular das frações obtidas por cromatografia. A dosagem de proteínas das frações foi realizada pelo método de Bradford (1976). Primeiramente fez-se a construção da curva padrão com solução BSA (albumina de soro bovino). As amostras foram centrifugadas e diluídas, na placa de Elisa, adicionou-se 200 µL do reagente Bradford e 7 µL da amostra sendo incubada por 10 min antes da leitura no espectrofotômetro a 595 nm.

#### 3.2 Análise de interação molecular pela técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS)

Foram realizados dois tipos de análise de interação molecular. Na primeira foi analisada a interação entre as proteínas do extrato bruto das formas promastigotas de *L.amazonensis* e as toxinas crotamina e crotoxina. Na segunda análise foi realizada a interação entre as toxinas (crotamina e crotoxina) e as partículas de PLGA. A preparação do extrato total proteico de *L. amazonensis* e o fracionamento das frações proteicas do parasita foram obtidas de acordo com a bula do kit (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit Cat. No. 539790. As análises de interação molecular entre as toxinas (50 µg/mL - analito)

e as proteínas do extrato bruto de *L. amazonensis* (75 µg/mL - ligante), bem como, as análises de interação entre as toxinas (100 µg/mL – ligante) e as micropartículas de PLGA (7 mg - filtradas e reconstituídas em água deionizada na diluição de 1:2), foram conduzidas via RPS em equipamento Biacore modelo T200 da GELifeScience, utilizando sensorchips tipo CM-5 como suporte para a molécula ligante. O método de acoplamento do ligante a superfície do chip a ser utilizado foi o acoplamento amina que consiste na ativação da matriz de dextrana utilizando como reagente 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida – HCl e N-Hidroxisuccinamida. Os ensaios de interação entre o ligante imobilizado e os analitos de interesse ocorreram em condições fisiológicas utilizando tampão HBS-P 1x (0,1M HEPES; 1,5M NaCl; 0,5% surfactante P20; pH 7,4), na temperatura de 37 °C.

### **3.3 Obtenção e cultivo de *Leishmania amazonensis***

#### **3.3.1 Parasitas**

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67PH8). A cultura inicial foi obtida de camundongos BALB/c previamente inoculados com *L. amazonensis* em uma das patas traseiras, conforme descrito em trabalhos do grupo de pesquisa (BARROS et al 2013).

#### **3.3.2 Cultivo do parasita**

Para o cultivo *in vitro* das promastigotas,  $5 \times 10^5$  parasitas por mL obtidas de cultura de 5º dia de crescimento (final da fase logarítmica), foram centrifugadas a 187 xg durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspendido em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB). Em seguida, uma alíquota de 10µL foi diluída no corante eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v), para a contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica de Neubauer (em microscópio óptico de campo claro com aumento de 400X). O número de promastigotas contadas foi multiplicado pela diluição e pelo fator de correção da câmara ( $10^4$ ) para se obter o número de parasitas por mL. As culturas de

promastigotas foram incubadas a 33°C e os parasitas repicados a cada cinco dias (BARROS et al., 2013).

### **3.4 Ação do veneno e das toxinas em solução sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis***

A viabilidade das promastigotas expostas às toxinas foi avaliada através do método colorimétrico empregando o sal MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (NICOLETE, et al, 2009). Aproximadamente  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* em início de fase estacionária foram incubadas com o veneno e as toxinas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL, em sextuplicata. Como controle negativo foi utilizado apenas promastigotas incubadas em meio de cultura, e como controle positivo, estas foram incubadas com solução de Pentamidina (100 µg/mL). A suspensão dos parasitas, foi ajustada por meio de contagem realizada em câmara de Neubauer (conforme descrito no item 3.3.2). A placa foi incubada a 25°C, durante 24 e 48h, e após este período foram adicionados 10 µL da solução de MTT, em todos os poços da placa. Esta foi incubada por mais 4 horas na mesma estufa. Após o período de incubação foram adicionados 50 µL de Dodecil Dissulfato de Sódio - SDS (20 % p/v) em cada poço. Após novo período de incubação (12h) em temperatura ambiente, as placas foram levemente agitadas e lidas espectrofotometricamente a 570 nm. (BARROS et al., 2013). Esse mesmo método foi empregado para avaliação da atividade de crotamina encapsulada em micropartículas poliméricas frente promastigotas de *L. amazonensis*.

### **3.5 Encapsulamento em sistema polimérico microparticulado**

Os sistemas foram obtidos pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, compostos pelas fases água-óleo-água (A/O/A) (NIWA et al., 1993; NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2011) e foram feitos dois lotes diferentes, o primeiro lote continha apenas partículas (controle), o segundo lote continha crotamina encapsulada. Brevemente, a fase orgânica foi composta pelo polímero PLGA (PURASORB® PDLG 5002, Purac Biomaterials, Holanda) (100 mg), com proporções iguais entre o ácido láctico e glicólico (50:50 m/m), dissolvidos no solvente diclorometano (10 mL P.A) (DINÂMICA, química contemporânea, Brasil). Um volume de 250 µL da fase aquosa contendo a toxina (4

mg/mL) foi vertida à fase orgânica e realizada homogeneização (homogeneizador modelo T18 basic ultra-turax, IKA, Alemanha) das fases a 15.500 rpm (2,5 min). Esta fase (A/O) foi vertida numa fase aquosa contendo tensoativo (Álcool polivinílico - PVA 3% m/v, 40 mL) (Mowiols 40–88, Sigma-Aldrich). A suspensão de partículas obtidas ficou sobre agitação branda e constante durante quatro horas para a evaporação do solvente. As partículas foram lavadas com água bi-destilada estéril (3 vezes) e centrifugadas (4.233  $\times$ g durante 5 min). Posteriormente as partículas foram congeladas (-80 °C) e liofilizadas (-40 °C), durante 12 horas.

### **3.6 Caracterização *in vitro* das partículas**

A distribuição dos diâmetros médios do sistema microparticulado foi determinada após reconstituição do mesmo em água bi-destilada, pela técnica de espalhamento de luz. A análise do Potencial Zeta das partículas foi realizada pela técnica de mobilidade eletroforética. O equipamento utilizado para estas caracterizações foi o Zeta Sizer Nano ZS (versão 6.20, número de série: MAL50088, Malvern instruments, Inglaterra). Ambas análises foram realizadas em triplicata. A forma e topografia das amostras foram observadas utilizando microscópio eletrônico de varredura (Jeol Scanning Microscope JSM 5200, Tokyo, Japão), no aumento de 1.00 kx. A taxa de encapsulação da crotamina a partir das partículas foi determinada através de dosagem proteica utilizando reagente de Bradford®. Resumidamente, 10 mg de cada lote de partículas foram pesados e solubilizados no solvente diclorometano. Esse solvente solubilizou as partículas e consequentemente, a crotamina encapsulada foi liberada da matriz polimérica. Os tubos contendo o solvente ficaram abertos para que o mesmo pudesse evaporar (12 h) e o precipitado formado foi ressuspensão em água deionizada. As amostras foram colocadas na placa juntamente com as concentrações da curva de BSA (1 a 0,03 mg/mL), adicionado o reagente de Bradford® e lidas espectrofotometricamente a 595 nm. Essa análise foi realizada em triplicata.

### **3.7 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c machos com 15 a 20 semanas de idade, com peso compreendido entre 18 e 20 g. Esses animais foram obtidos do biotério do IPEPATRO/FIOCRUZ e mantidos em condições de livre acesso à água e ração, respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12 h. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as

normas estabelecidas pela Comissão de Ética do IPEPATRO/ FIOCRUZ-RO para o uso experimental de animais (Protocolo aprovado nº 2012/06).

### **3.8 Obtenção de macrófagos peritoneais**

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, os camundongos BALB/c foram inoculados com 2 mL de solução de Tioglicolato 3% (p/v) através de administração parenteral intraperitoneal (GORDON et al., 1974). Após quatro dias, os animais foram mortos por deslocamento cervical e 5 mL de PBS 1x (Solução Salina Tamponada 1x) à 4 °C foram injetados na cavidade peritoneal e em seguida recuperados com a própria seringa. O líquido recolhido foi lavado duas vezes por centrifugação 187 *xg* durante 10 min a 4 °C e o precipitado ressuspenso em 1 mL de meio RPMI suplementado (10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina). As células obtidas foram diluídas em corante azul de trypan 0,01% (p/v) e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (em microscópio óptico de campo claro com aumento de 400X) para se obter a concentração ideal de células a ser incubada conforme o ensaio a ser realizado (BARROS et al., 2013).

### **3.9 Ensaio de toxicidade celular**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos conforme o item anterior e a suspensão de células, contendo aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL, foi ajustada por meio da contagem realizada em câmara de Neubauer com o reagente de exclusão Azul de Trypan. Após obtenção e plaqueamento das células, foram adicionadas as diferentes preparações microparticuladas, bem como a crotamina em solução. A placa foi incubada a 37°C, durante 24 h, e após este período foram adicionados 10 µL da solução de MTT, em todos os poços da placa. Esta foi incubada por mais 4h na mesma estufa. Após o período de incubação foram adicionados 50 µL de SDS (20 % p/v) em cada poço. Após novo período de incubação (12 h) em temperatura ambiente, as placas foram levemente agitadas e lidas a 570 nm em leitor espectrofotométrico. Como controle negativo foi utilizado apenas células incubadas em meio de cultura, e como controle positivo foi utilizado uma solução de SDS 10% (p/v). A taxa de citotoxicidade foi calculada como sendo: % citotoxicidade de cada preparação =  $1 - (\text{média D. O. teste} / (\text{média D. O. das células em meio de cultura (controle negativo)} \times 100$ . Ensaio realizado em sextuplicata (BARROS et al., 2013).

### 3.10 Ensaio de captura das partículas

Macrófagos peritoneais foram incubados com 100 µg/mL de cada preparação de micropartícula durante 24 horas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, o meio foi aspirado e reservado para quantificação de citocinas. As partículas não internalizadas foram removidas por três lavagens com PBS. Meio RPMI gelado foi adicionado em cada poço e um removedor de células (*cell scraper*) foi utilizado para que os macrófagos aderidos fossem removidos e ficassem suspensos no meio. O meio contendo os macrófagos foi aspirado e as células foram lavadas por citocentrifugação seguida de coloração panótica. A porcentagem de células com no mínimo uma partícula internalizada, e também, a capacidade fagocítica dos macrófagos, ou seja, o índice Fagocítico (IF) foram calculados utilizando-se a seguinte equação:  $IF (\%) = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{MØ contendo partículas}} \div 100$ . Ensaio realizado em triplicata (NICOLETE, et al 2011).

### 3.11 Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com promastigotas de *L. amazonensis*

Macrófagos peritoneais foram coletados como descrito no item 3.8 e utilizados para os ensaios de infecção. Para este ensaio,  $5 \times 10^5$  células, em 500 µL de meio de cultura RPMI completo, foram plaqueadas em lamínulas circulares de vidro estéreis em placas de 24 poços (Costar 3596, Corning, USA), por 24 horas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com meio RPMI 1640 em temperatura ambiente para remoção de células não aderidas e os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na taxa de 5 parasitas para 1 macrófago. Estas células foram incubadas durante 4 horas a 33°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os poços foram novamente lavados com RPMI 1640 duas vezes e incubados com 100 µg/mL de cada preparação microparticulada, bem como, a crotamina em solução, na mesma concentração. As culturas foram mantidas durante 24 horas a 33°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O número de parasitas intracelulares, ou seja, as amastigotas foi avaliado pela contagem de 100 macrófagos em microscópio óptico de campo claro em aumento de 1000X após coloração das lâminas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG) (GIAIMIS et al., 1992). Resumidamente, as células foram lavadas com meio de cultura e uma alíquota de soro fetal bovino foi colocada sobre a lamínula ficando em temperatura ambiente até secar naturalmente. Depois de secas, o corante May Grünwald foi adicionado sobre as lamínulas por aproximadamente 30 segundos e em

seguida foi adicionado água destilada para remover o excesso do corante. O corante Giemsa, que é preparado no momento do uso pela adição de uma gota do corante para cada mililitro de água destilada, foi acrescentado, por 45 segundos. Finalmente, a lamínula foi lavada rapidamente com água destilada e depois de seca foi colada em uma lâmina utilizando bálsamo. A taxa de infecção foi determinada pela porcentagem de macrófagos infectados. Além disso, foi determinado o índice fagocítico utilizando-se o número de amastigotas dentro de cada macrófago infectado. O índice fagocítico (IF), ou a capacidade fagocitária dos macrófagos foi calculada utilizando-se a seguinte equação:  $IF (\%) = \frac{\text{Amastigotas contadas}}{\text{MØ contendo Amastigotas}} \times 100$ . Ensaio realizado em triplicata (BARROS et al., 2013).

### **3.12 Quantificação da citocina TNF- $\alpha$ no sobrenadante celular**

Para quantificação da citocina, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpos de captura (anti-TNF- $\alpha$ ) solubilizados em tampão fosfato 0,1M pH 9,0, durante 12 horas, a 4° C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-Tween (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e, posteriormente, os sítios livres foram bloqueados com 200  $\mu$ L de tampão de bloqueio, contendo 10% de SBF em PBS e a placa incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween e adicionados 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultura das células ou padrões e incubados durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-Tween e 100  $\mu$ L de solução de anticorpos biotinilados anti-citocina foram adicionados e incubados por 1h a temperatura ambiente. Após cinco lavagens, a presença de anticorpos biotinilados foi detectada com 100  $\mu$ L de streptavidina-peroxidase (1:250). Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, a placa foi lavada sete vezes com PBS-Tween e adicionados 100  $\mu$ L de reagente cromogênio (tetrametilbenzidina 0,1 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato-citrato 0,05M (pH 5,0), contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 30 min de incubação a temperatura ambiente, pela adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1M. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com a citocina recombinante (1000 a 15,6 pg/mL). Ensaio realizado em triplicata.

### **3.13 Análise estatística dos dados**

Foram utilizados testes estatísticos de análise de variância de um fator (ANOVA one-way - Tukey) e Post test (t-test) e os resultados que  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O programa utilizado para fazer as análises foi o Graph Pad Prism versão 5.



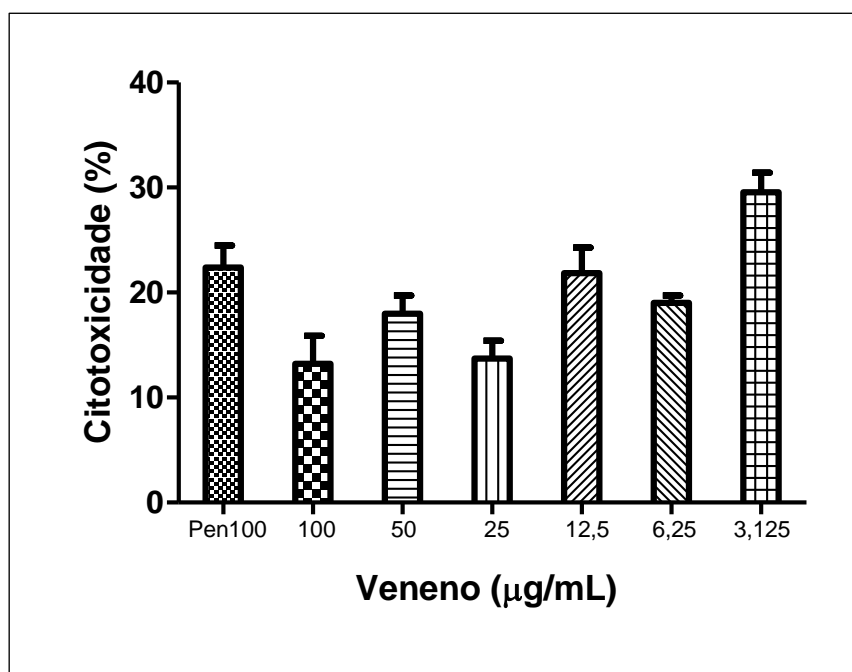
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 PARTE I: ESTUDOS ENVOLVENDO A ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E INTERAÇÃO MOLECULAR DE CROTAMINA E CROTOXINA**

#### 4.1.1 Avaliação da atividade antileishmania do veneno de *C.d.terrificus*

A Figura 2 representa a atividade do veneno de *C.d.terrificus* contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*. Esse resultado foi obtido pelo método de MTT, no qual, o controle positivo utilizado foi a pentamidina (fármaco utilizado na quimioterapia da leishmaniose) que inibiu 23% dos parasitas. A concentração de 100 µg/mL inibiu 13% das promastigotas. A concentração de 50 µg/mL inibiu 18% dos parasitas. As concentrações de 25 e 12,5 µg/mL apresentaram inibição de 14 e 22%, respectivamente. A concentração de 6,25 µg/mL inibiu 19% dos parasitas. A maior inibição observada foi aquela representada pela menor concentração do veneno: 3,12 µg/mL, a qual inibiu cerca de 29% das promastigotas.

**Figura 2. Atividade antileishmania do veneno de *C.d.terrificus*.**

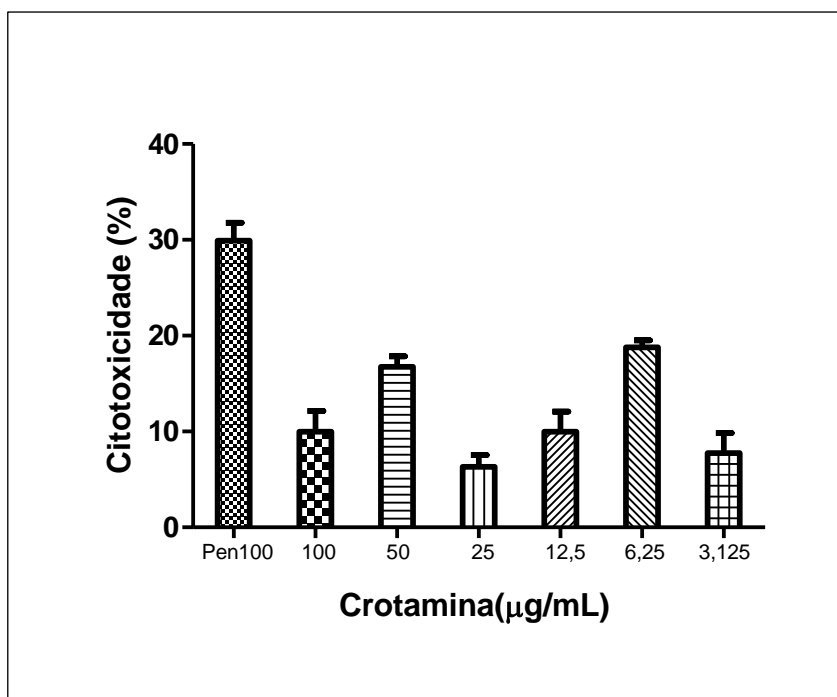


Avaliação da atividade antileishmania do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, após 24 horas de incubação a 33°C em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Controle de morte utilizado foi o fármaco pentamidina na concentração de 100 µg/mL (Pen100); Testes do veneno 100 µg/mL (100); veneno 50 µg/mL (50); veneno 25 µg/mL (25); veneno 12,5 µg/mL (12,5); veneno 6,25 µg/mL (6,25) e veneno 3,125 µg/mL (3,125). Método colorimétrico de MTT. Ensaio realizado em sextuplicata.

#### 4.1.2 Avaliação da atividade antileishmania da crotamina

A Figura 3 representa a atividade antileishmania apresentada pela toxina crotamina, pelo método colorimétrico de MTT. O resultado obtido mostra que o controle positivo utilizado (pentamidina, 100 µg/mL) inibiu 30% dos parasitas. As concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL, inibiram: 10%, 16% e 7,0%, respectivamente. A concentração de 12,5 µg/mL, inibiu 10% dos parasitas. A concentração de 6,25 µg/mL inibiu cerca de 18% das promastigotas e a menor concentração (3,12 µg/mL) apresentou inibição de aproximadamente 8% dos parasitas, valor próximo dos observados para as maiores concentrações testadas.

**Figura 3. Atividade antileishmania da crotamina em solução.**

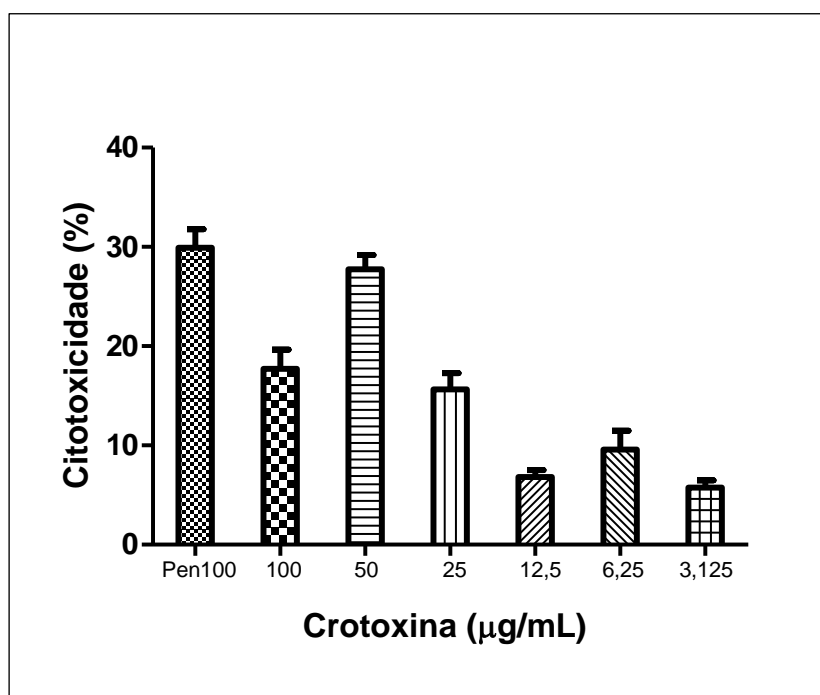


Avaliação da atividade antileishmania de crotamina em solução, após 24 horas de incubação a 33°C em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Método colorimétrico de MTT. O controle de morte utilizado foi o fármaco pentamidina na concentração de 100 µg/mL (Pen100); Testes de crotamina 100 µg/mL (100); crotamina 50 µg/mL (50); crotamina 25 µg/mL (25); crotamina 12,5 µg/mL (12,5); crotamina 6,25 µg/mL (6,25) e crotamina 3,125 µg/mL (3,125). Ensaio realizado em sextuplicata.

#### 4.1.3 Avaliação da atividade antileishmania de crotoxina

A Figura 4 representa a avaliação da atividade antileishmania de crotoxina, pelo método colorimétrico de MTT. O resultado obtido mostra que o controle positivo (o fármaco pentamidina) inibiu aproximadamente 30% das promastigotas. A concentração de 100 µg/mL de crotoxina inibiu cerca de 18% dos parasitas. A maior inibição observada foi de aproximadamente 28%, correspondente à concentração de 50 µg/mL, inibição próxima da que foi observada para o controle positivo (pentamidina). A concentração de 25 µg/mL, foi responsável por 16% de inibição. As concentrações 12,5 e 6,25 µg/mL apresentaram valores de inibição de 7 e 9%, respectivamente. A menor concentração (3,12 µg/mL) apresentou a menor inibição (6,0%).

**Figura 4. Atividade antileishmania da crotoxina em solução.**

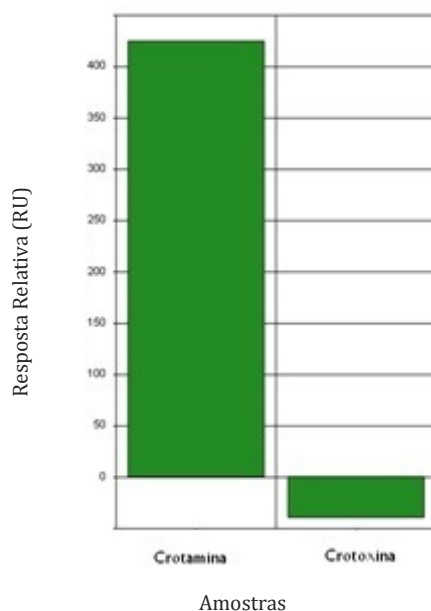


Avaliação da atividade antileishmania de crotoxina em solução, após 24 horas de incubação a 33°C em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Método colorimétrico de MTT. Controle de morte utilizado foi o fármaco pentamidina na concentração de 100 µg/mL (Pen100); Testes de crotoxina 100 µg/mL (100); crotoxina 50 µg/mL (50); crotoxina 25 µg/mL (25); crotoxina 12,5 µg/mL (12,5); crotoxina 6,25 µg/mL (6,25) e crotoxina 3,125 µg/mL (3,125). Ensaios realizados em sextuplicata.

#### 4.1.4 Análise da interação molecular por RPS

O gráfico de interação molecular entre as toxinas e o extrato proteico de *L. amazonensis* (Figura 4) mostrou que a crotoxina não teve nenhuma afinidade e/ou interação com as proteínas de *L. amazonensis*. Por outro lado, a crotamina teve uma interação de aproximadamente 450 RU (Unidades de Ressonância).

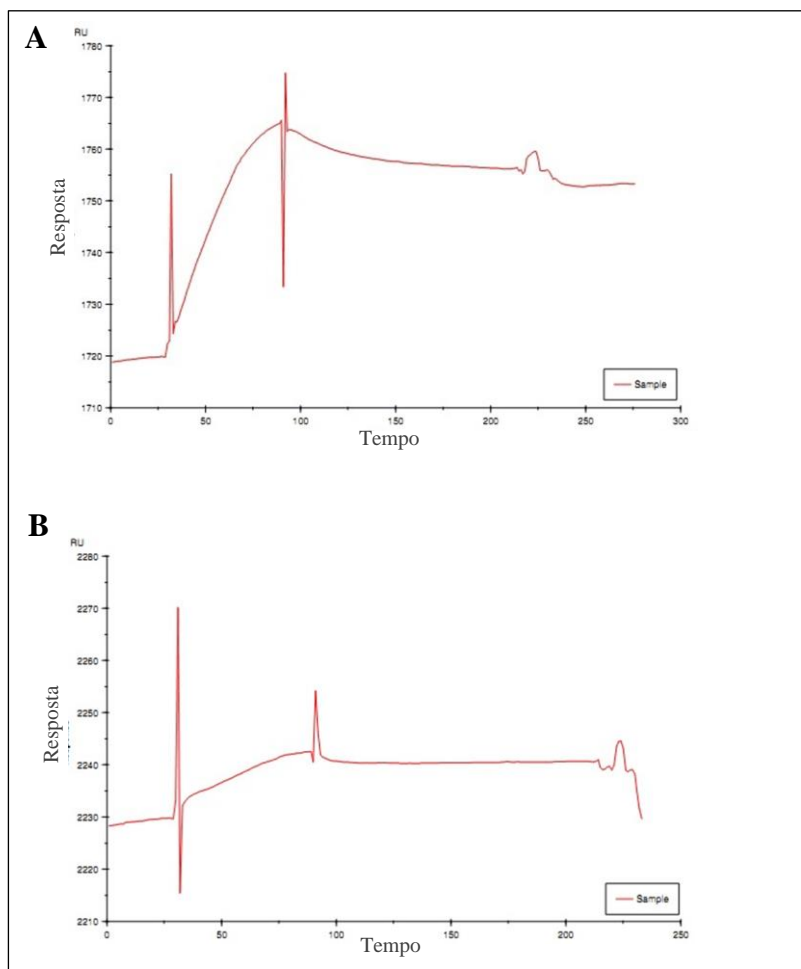
**Figura 5. Interação molecular de crotamina e crotoxina com extrato bruto proteico das formas promastigotas de *L. amazonensis*.**



Análise de interação de crotamina e crotoxina 50 µg/mL (analitos) com proteínas do extrato bruto de *L. amazonensis* 75 µg/mL (ligante). Método de Ressonância Plasmônica de Superfície.

O gráfico de interação molecular entre as toxinas e as micropartículas de PLGA (Figura 6), mostrou que a crotamina teve uma elevada afinidade, ou seja, interação com as micropartículas fixadas ao chip (Figura 6A). Por outro lado, a crotoxina teve uma baixa interação ou afinidade as micropartículas de PLGA (Figura 6B).

**Figura 6. Interação molecular entre as toxinas (crotamina e crotoxina) e as micropartículas de PLGA**



Análise de interação molecular entre crotamina 100 µg/mL (A) e crotoxina 100 g/mL (B) (analitos) com as micropartículas de PLGA (7mg/mL) (ligante). Método de Ressonância Plasmônica de Superfície.

Estes ensaios preliminares foram realizados para que fosse possível selecionar a toxina que apresentasse maior ação antileishmania e principalmente, afinidade ou interação com as formas promastigotas de *L. amazonensis*. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a crotamina encapsulada em sistema de liberação modificada na forma de micropartículas poliméricas torna-se uma promissora estratégia de entrega intracelular.

## **4.2 PARTE II: ESTUDOS ENVOLVENDO A LIBERAÇÃO MODIFICADA DA CROTAMINA E ATIVIDADE ANTILEISMANIA**

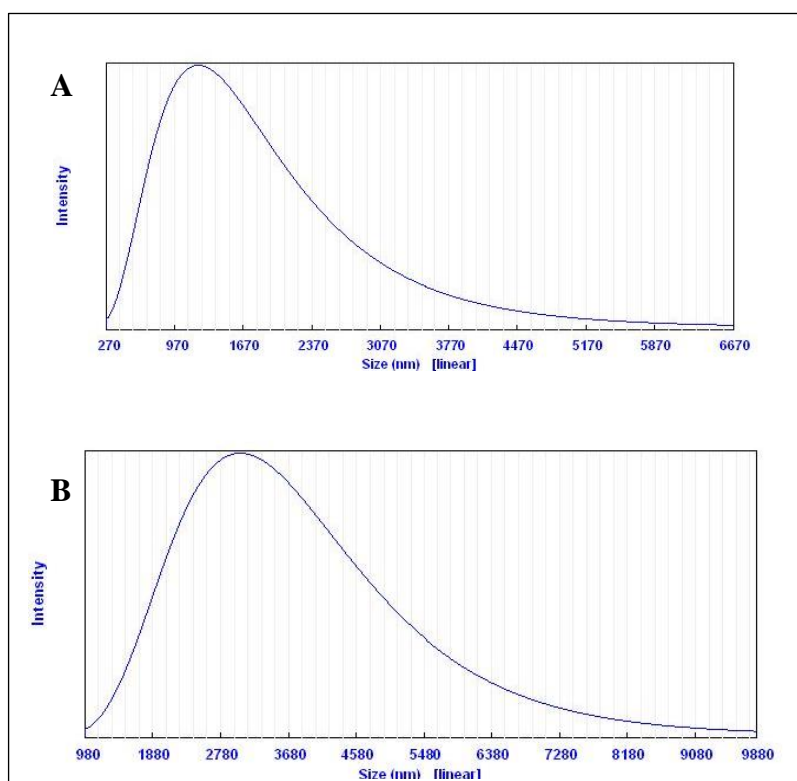
#### 4.2.1 Avaliação Taxa de encapsulação de crotamina

A taxa de encapsulação de crotamina a partir da concentração inicial de 4 mg/mL foi de 32,5%, que corresponde à 0,13 mg/mg de partícula.

#### 4.2.2 Análise dos diâmetros das partículas

A Figura 7 mostra a distribuição dos diâmetros das partículas avaliadas. A Figura 7A mostra que o diâmetro médio das micropartículas controle foi de 1,35  $\mu\text{m}$ . O índice de polidispersão (IP) dessa amostra foi de 1,7. A Figura 7B mostra que o diâmetro médio das micropartículas contendo crotamina foi de 3,09  $\mu\text{m}$ , nas mesmas condições estabelecidas para as micropartículas controle e o índice de polidispersão (IP) desse lote de partículas foi 0,09.

**Figura 7. Distribuição dos diâmetros médios obtidos para as micropartículas controle (A) e micropartículas contendo crotamina (B)**



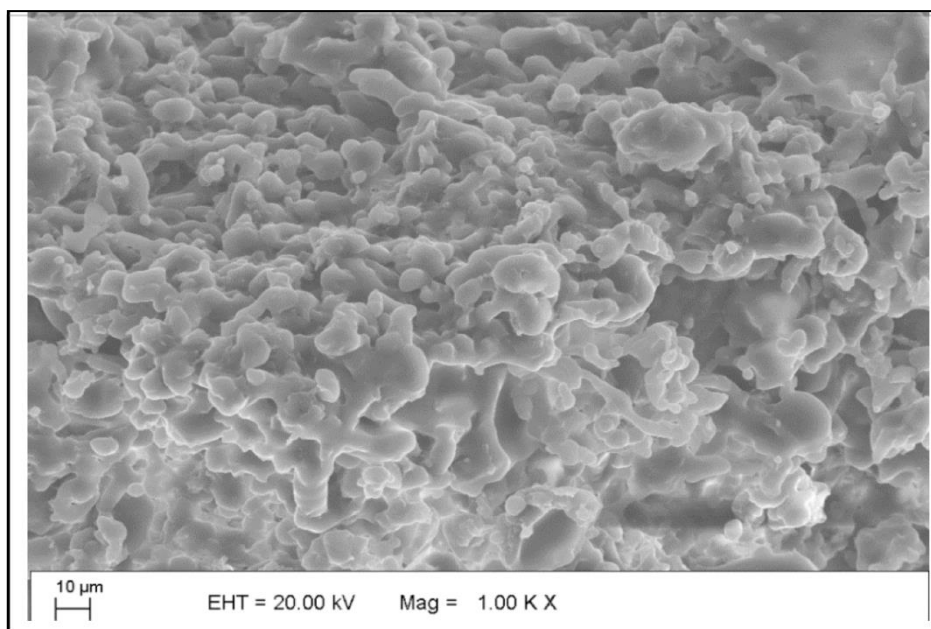
Diâmetro médio das micropartículas controle, ou seja, sem incorporação da crotamina (A) e das partículas contendo crotamina (B).



### 4.2.3 Análise da morfologia das partículas

A análise da forma e topografia das micropartículas mostrou formas esféricas, superfícies uniformes e homogêneas, porém houve formação de muitos agregados, possivelmente em virtude da amostra não ter sido ressuspensa em meio aquoso, para realização da análise (Figura 7).

**Figura 8. Fotomicrografia eletrônica de varredura das micropartículas contendo crotamina**



Representação da morfologia das micropartículas contendo crotamina, avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de 1.00 Kx

### 4.2.4 Análise do Potencial Zeta

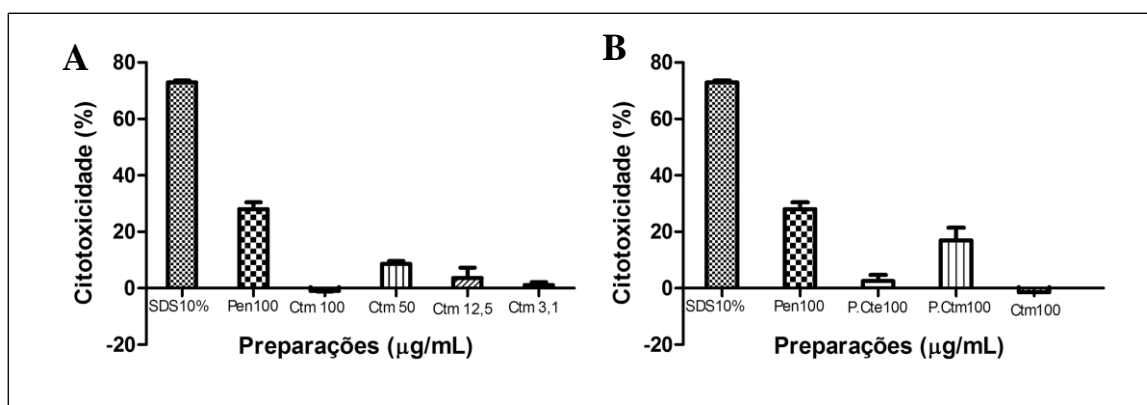
Quando as partículas são produzidas, as moléculas do surfactante (PVA) formam uma camada ao redor da superfície do polímero, conferindo um potencial elétrico na partícula, denominado Potencial Zeta. As micropartículas sem a incorporação de crotamina tiveram um potencial correspondente à -12,3 mV. Já o potencial elétrico das micropartículas contendo crotamina foi de -20,9 mV.

#### 4.2.5 Atividade da crotamina em solução e encapsulada contra *L. amazonensis*

A Figura 9 mostra a atividade de crotamina em solução e encapsulada sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 24 horas de incubação. A figura 9A mostra o resultado de crotamina em solução, no qual, dois controles positivos de morte foram utilizados, o SDS 10% (inespecífico) e a pentamidina (fármaco específico). O SDS teve 72% de toxicidade, enquanto a pentamidina na concentração de 100 µg/mL mostrou 28% de inibição. A crotamina em solução (100 µg/mL) não apresentou nenhuma toxicidade contra os parasitas. As concentrações de 50 e 12,5 µg/mL apresentaram toxicidade de 8% e 3% respectivamente. A concentração de 3,1 µg/mL inibiu apenas 1% das promastigotas.

Na Figura 9B foi possível observar que o SDS foi responsável por 72% de toxicidade. Já a pentamidina (100 µg/mL) mostrou 28% de inibição. As micropartículas controle (100 µg/mL) apresentaram toxicidade de apenas 2%. As micropartículas contendo crotamina na concentração de 100 µg/mL mostraram inibição de 16% das formas promastigotas. A crotamina em solução (100 µg/mL) não inibiu os parasitas.

**Figura 9. Avaliação da atividade antileishmania da crotamina em solução e encapsulada após 24 horas de incubação**

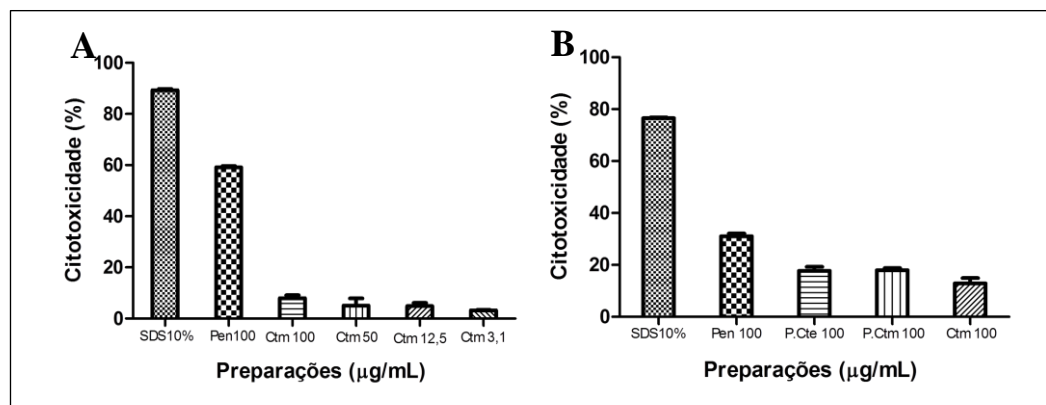


Avaliação da atividade de crotamina em solução e encapsulada contra promastigotas de *L. amazonensis*, após 24 horas de incubação a 25°C. Avaliação de crotamina em solução (A), controles positivos SDS 10% e fármaco pentamidina 100 µg/mL (Pen100); Crotamina 100 µg/mL (Ctm100); crotamina 50 µg/mL (Ctm50); crotamina 12,5 µg/mL (Ctm12,5) e crotamina 3,1 µg/mL (Ctm 3,1). Avaliação de crotamina encapsulada (B), controles positivos SDS 10% e fármaco pentamidina 100 µg/mL (Pen100), partículas controle 100 µg/mL (P.Cte100); partícula contendo crotamina 100 µg/mL (P.Ctm100) e crotamina em solução 100 µg/mL (Ctm100). Método colorimétrico de MTT. Ensaio realizado em sextuplicata. Valores expressos em média ± Desvio Padrão.

A Figura 10 mostra a atividade de crotamina em solução e encapsulada sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 48 horas de incubação. A figura 10A mostra o resultado de crotamina em solução, no qual, dois controles positivos de morte foram utilizados, o SDS 10% (inespecífico) e a pentamidina (fármaco específico). O SDS apresentou 87% de toxicidade, enquanto a pentamidina na concentração de 100 µg/mL mostrou 59% de inibição. A crotamina em solução (100 µg/mL) apresentou 8% de toxicidade, enquanto as concentrações de 50 e 12,5 µg/mL apresentaram toxicidade de 5% e 4,9% respectivamente. A concentração de 3,1 µg/mL apresentou a menor inibição observada (3%).

Na Figura 10B foi possível observar que o SDS foi responsável por 77% de toxicidade. Já a pentamidina (100 µg/mL) mostrou 32% de inibição. As micropartículas controle apresentaram toxicidade de 17,6%. As micropartículas contendo crotamina, na concentração de 100 µg/mL mostraram inibição de 18% das formas promastigotas. A crotamina em solução (100 µg/mL) inibiu 12% dos parasitas.

**Figura 10. Avaliação da atividade antileishmania da crotamina em solução e encapsulada após 48 horas de incubação**

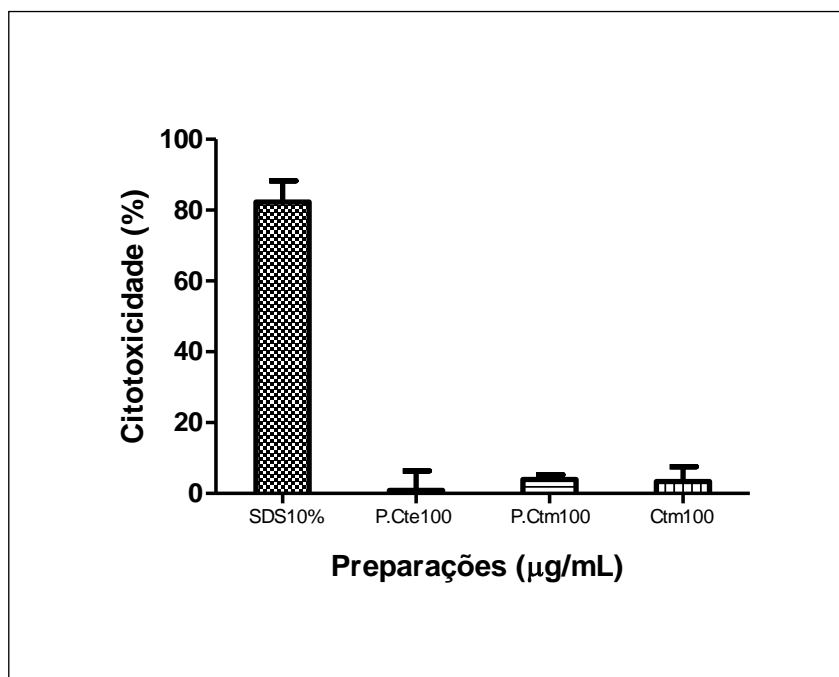


Avaliação da atividade de crotamina em solução e encapsulada contra promastigotas de *L. amazonensis*, após 48 horas de incubação a 25°C. Avaliação de crotamina em solução (A), controles positivos SDS 10% e fármaco pentamidina 100 µg/mL (Pen100); Crotamina 100 µg/mL (Ctm100); crotamina 50 µg/mL (Ctm50); crotamina 12,5 µg/mL (Ctm12,5) e crotamina 3,1 µg/mL (Ctm 3,1). Avaliação de crotamina encapsulada (B), controles positivos SDS 10% e fármaco pentamidina 100 µg/mL (Pen100), partículas controle 100 µg/mL (P.Cte100); partícula contendo crotamina 100 µg/mL (P.Ctm100) e crotamina em solução 100 µg/mL (Ctm100). Método colorimétrico de MTT. Ensaio realizado em sextuplicata. Valores expressos em média ± Desvio Padrão.

#### 4.2.6 Avaliação da toxicidade crotamina em solução e encapsulada frente macrófagos murinos

A Figura 11 mostra o ensaio de toxicidade de crotamina frente a macrófagos peritoneais, pelo método colorimétrico de MTT. Nesse ensaio, quatro preparações foram testadas, dentre elas um controle positivo de morte que foi o SDS 10% (inespecífico). As outras testadas foram as micropartículas controle, as micropartículas contendo crotamina (100 µg/mL) e crotamina em solução (100 µg/mL). A maior toxicidade observada foi a do controle positivo, conforme esperado, que inibiu 80% da população de macrófagos. As micropartículas controle e contendo crotamina apresentaram citotoxicidade de 1% e 5%, respectivamente. A crotamina em solução também apresentou baixa citotoxicidade (3%).

**Figura 11. Avaliação da toxicidade de crotamina em solução e encapsulada contra macrófagos peritoneais murinos**

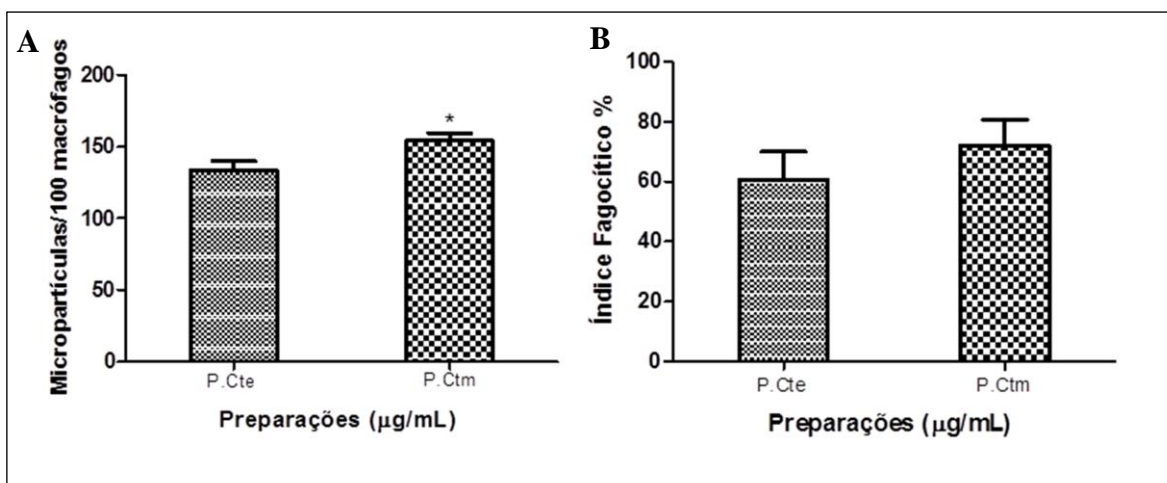


Ensaio de Citotoxicidade de crotamina em solução e encapsulada em micropartículas de PLGA. Ensaio realizado com macrófagos peritoneais murinos pelo método colorimétrico de MTT, incubados durante 24 h a 37°C em estufa com atmosfera úmida (5% CO<sub>2</sub>). O controle positivo de morte utilizado foi o SDS 10% (inespecífico). As células foram incubadas com micropartículas controle (100 µg/mL) (P.Cte); micropartículas contendo crotamina (100 µg/mL) (P.Ctm) e crotamina em solução (100 µg/mL) (Ctm). Valores expressos em média ± Desvio Padrão. Experimento realizado em sextuplicata.

#### 4.2.7 Avaliação da captura de partículas pelos macrófagos murinos

A Figura 12A mostra a quantidade de micropartículas por 100 macrófagos contados, na qual, 130 micropartículas controle foram internalizadas pelos macrófagos. Foi possível observar que a quantidade de micropartículas internalizadas contendo crotamina em comparação com as controle, representou aumento significativo de 13,3% (150 micropartículas capturadas). A Figura 12B mostra o Índice Fagocítico de micropartículas controle e contendo crotamina. Após obtenção do índice foi possível observar que as micropartículas controle tiveram um índice de aproximadamente 60%, enquanto as micropartículas contendo crotamina apresentaram valor de aproximadamente 72% (aumento de 16,6%).

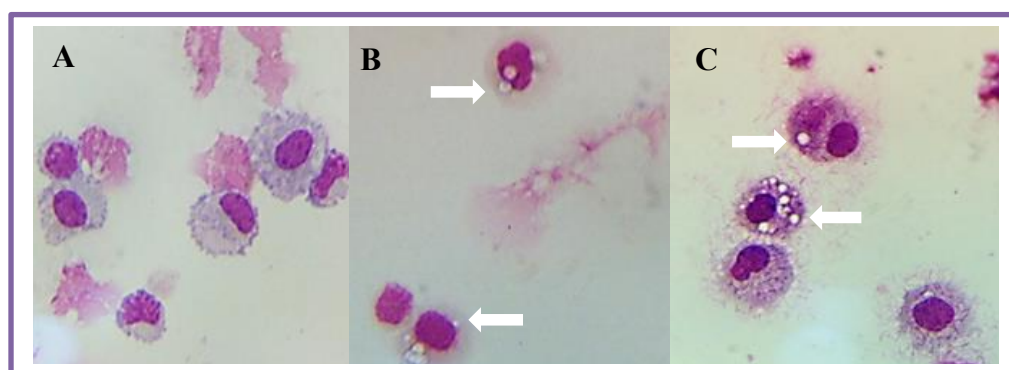
**Figura 12. Ensaio de captura de micropartículas por macrófagos peritoneais.**



Ensaio de captura de micropartículas de PLGA, após 24 horas de incubação. (A) Número de micropartículas por 100 macrófagos contados e (B) Índice Fagocítico. As células foram incubadas com micropartículas controle (100 µg/mL) (P.Cte) e micropartículas contendo crotamina (100 µg/mL) (P.Ctm). Valores expressos em média  $\pm$  Desvio Padrão. \*P < 0.05.

Na Figura 13 é possível visualizar as células desse ensaio de captura de micropartículas. O painel 13A mostra apenas macrófagos que foram incubados como controle, para observação da morfologia das células. O painel 13B mostra macrófagos incubados com as micropartículas controle (as micropartículas são as esferas refringentes distribuídas no citosol dos macrófagos, indicados pelas setas brancas). Já o painel 13C mostra a captura das micropartículas contendo crotamina. Nesse é possível observar que a quantidade de micropartículas no interior das células é maior que a visualizada no painel 13B, o que ilustra os resultados obtidos no experimento de contagem (Figura 12).

**Figura 13. Fotomicrografias representativas do ensaio de captura das micropartículas pelos macrófagos peritoneais**



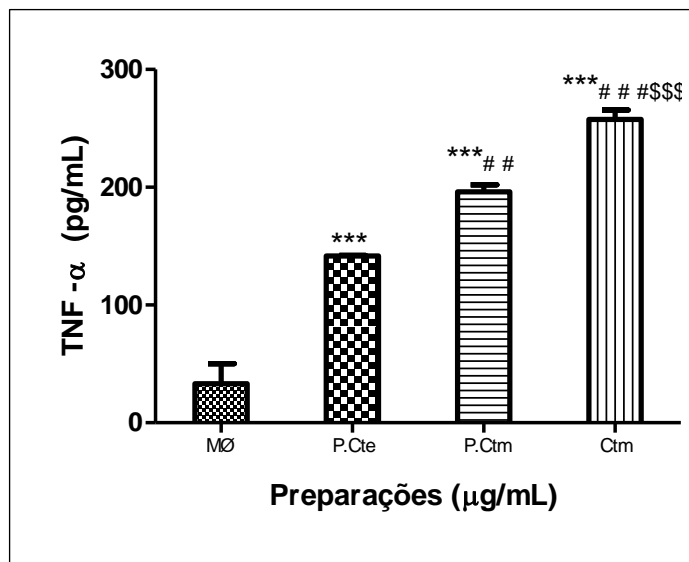
Fotomicrografias do ensaio de captura das partículas, adquiridas por microscopia de campo claro. Aumento de 1.000 X. Macrófagos sem partículas (A), macrófagos contendo partículas controle, ou seja, sem incorporação de crotamina (B) e micropartículas contendo crotamina (C). As setas brancas representam as partículas engolfadas. Tempo de incubação de 24 horas.

#### **4.2.8 Níveis de TNF- $\alpha$ produzidos por macrófagos peritoneais após incubação com as micropartículas**

O sobrenadante dos macrófagos utilizados no experimento de captura das partículas foi armazenado, para que se pudesse investigar se as partículas estavam ativando os macrófagos para a produção de citocinas. Como critério desta ativação foi escolhida a citocina TNF-  $\alpha$ . A Figura 14 mostra que apenas macrófagos (controle) produzem baixos níveis desta citocina (33 pg/mL). As micropartículas controle foram capazes de ativar os macrófagos para

a produção de TNF- $\alpha$  (141 pg/mL), valor 76,5% maior se comparado ao controle. Os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos por macrófagos ativados por micropartículas contendo crotamina também foram elevados (196 pg/mL), valor 83% maior comparado ao controle e 28% maior comparado às micropartículas controle. A crotamina em solução (100  $\mu$ g/mL) foi capaz de induzir os níveis mais elevados da citocina (257 pg/mL), valor 87% maior comparado ao controle e 23% maior quando comparado a amostra de micropartículas contendo crotamina.

**Figura 14. Quantificação de TNF- $\alpha$  no sobrenadante do ensaio de captura das micropartículas pelos macrófagos peritoneais**



Níveis de TNF- $\alpha$  detectados nos sobrenadantes do experimento de captura de micropartículas por macrófagos peritoneais, em pg/mL. Foram incubados: macrófagos (MØ); micropartículas controle 100  $\mu$ g/mL (P.Cte); micropartículas contendo crotamina 100  $\mu$ g/mL (P.Ctm) e crotamina em solução 100  $\mu$ g/mL (Ctm). As médias  $\pm$  DP com diferença estatisticamente significativa foram representadas pelo símbolo \*\*\*  $P < 0,001$ , quando comparadas ao controle; ##  $P < 0,01$  e ###  $P < 0,001$ , quando comparadas às partículas controle; \$\$\$  $P < 0,001$ , quando comparadas às partículas contendo crotamina.

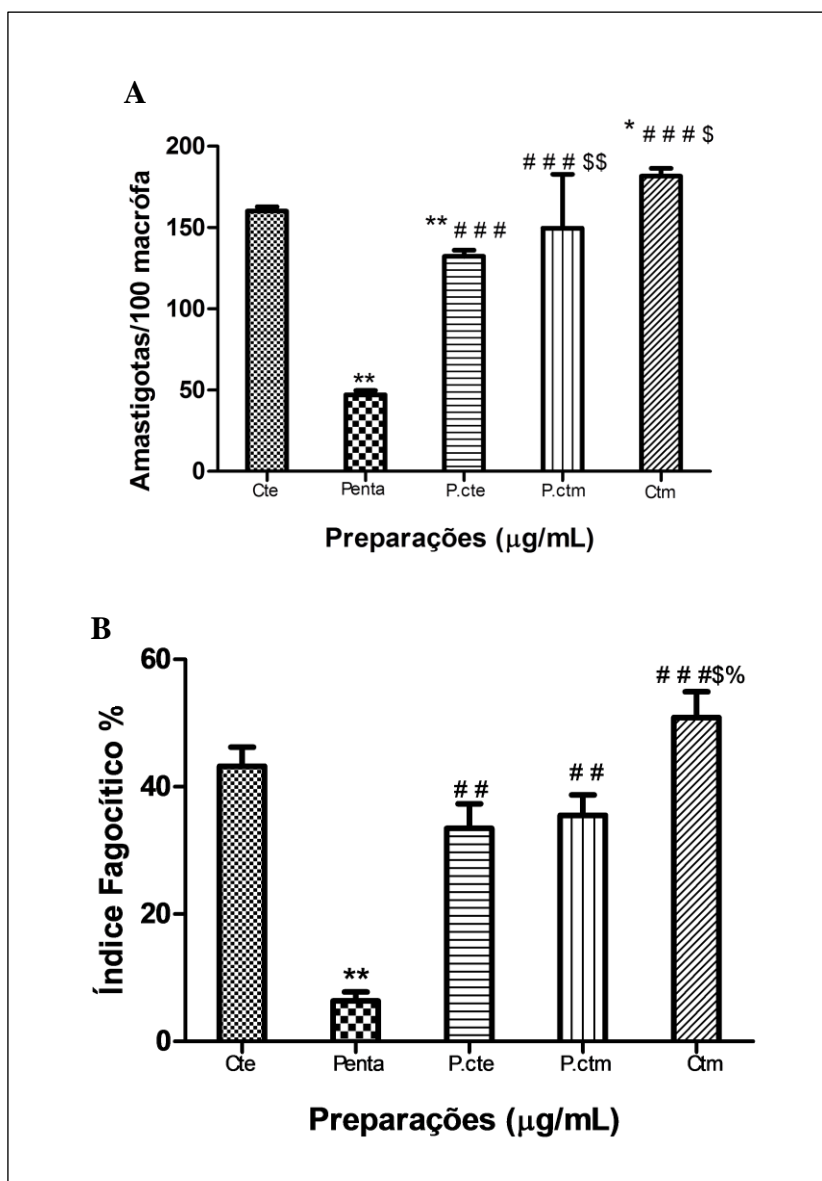
#### **4.2.9 Avaliação da atividade das micropartículas contendo crotamina sobre o crescimento/sobrevivência das formas amastigotas**

Nesse experimento foram utilizados dois controles, um negativo e um positivo. O controle negativo continha apenas macrófagos infectados com *L. amazonensis* e o controle positivo de morte utilizado foi a pentamidina (100 µg/mL). A Figura 15A mostra a quantidade de amastigotas em 100 macrófagos contados após 24 h de incubação. Nos macrófagos do controle negativo foram contadas em média 160 amastigotas. No controle positivo, foram contadas apenas 47 parasitas (70% menos parasitas que o controle negativo). Nos macrófagos que foram incubados com as micropartículas controle foram contadas 132 amastigotas, ou seja, houve uma redução de 17,5% dos parasitas comparados ao controle negativo. Na contagem das células incubadas com as micropartículas contendo crotamina foi observado 149 parasitas. Apesar de se observar aumento significativo (11,4%) da quantidade de parasitas em relação às micropartículas controle, houve redução também significativa (6,8%) da quantidade de parasitas em comparação com o controle negativo. Por outro lado, a crotamina em solução (100 µg/mL) foi responsável pelo valor mais elevado de parasitas intracelulares (181 amastigotas contadas).

O Índice Fagocítico (Figura 15B) apresentado pelo controle negativo foi de 43,2%. O controle positivo mostrou um índice de 6,3% (85% menor que o IF do controle negativo). O índice apresentado pelas micropartículas controle foi de 35,8%, ou seja, 17,1% menor que o do controle negativo. A preparação que apresentou o menor Índice Fagocítico foram as micropartículas contendo crotamina (29,2%), na qual se observa uma redução de significativa de 32,4%. O índice apresentado pela preparação de crotamina em solução foi o maior observado (50,8%), 14,9% maior que o do controle negativo.



**Figura 15. Avaliação da atividade de crotamina em solução e encapsulada sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* após 24 horas**

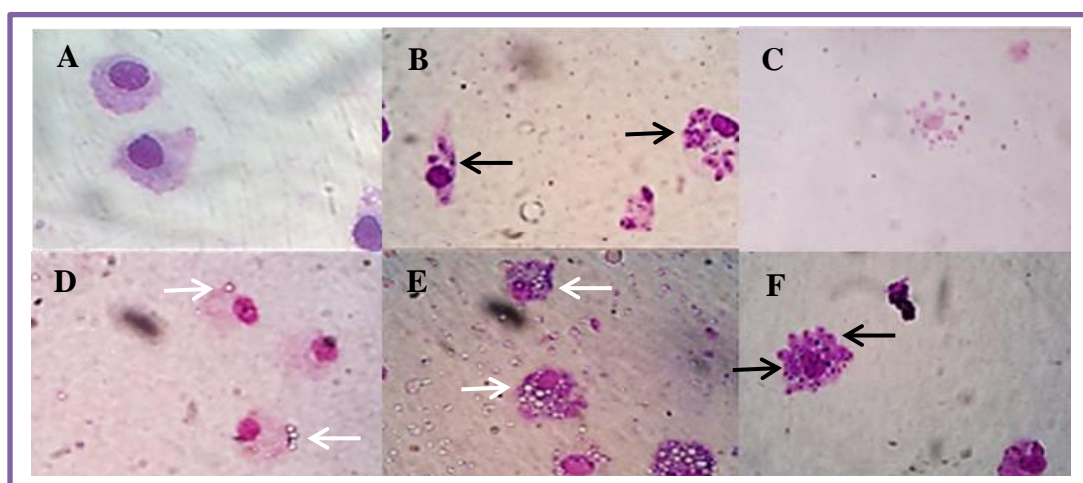


Avaliação da atividade de crotamina encapsulada e em solução sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*, após 24 horas de incubação a 33°C em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Determinação da quantidade de amastigotas por 100 macrófagos contados (A) e Índice Fagocítico (B). Macrófagos infectados (Cte); Pentamidina 100 µg/mL (Penta); micropartículas controle 100 µg/mL (P.Cte); micropartículas contendo crotamina 100 µg/mL (P.Ctm) e crotamina em solução 100 µg/mL (Ctm). As médias  $\pm$  DP com diferença estatisticamente significativa foram representadas pelos símbolo \*P < 0,05 e \*\* P < 0,01, quando comparadas ao controle; ## P < 0,01 e ### P < 0,001, quando comparadas ao fármaco pentamidina; \$ P < 0,05 e \$\$ P < 0,01, quando comparada às partículas controle; % P < 0,05 quando comparada às micropartículas contendo crotamina.

Na Figura 16 é possível visualizar as células do ensaio de captura de *L. amazonensis* pelos macrófagos peritoneais. Essas imagens foram obtidas através de microscopia de campo claro com utilização de lente objetiva de aumento 100x e óleo de imersão (aumento total de 1.000x). O painel 16A há apenas macrófagos que não continham *L. amazonensis* nem micropartículas. O painel 16B mostra os macrófagos infectados por *Leishmania* e estas estão no citosol das células (setas pretas). O painel 16C mostra macrófagos infectados e incubados com pentamidina (100 µg/mL), no qual é possível observar que a célula está destruída pela toxicidade desse fármaco.

O painel 16D mostra as micropartículas controle, internalizadas em macrófagos infectados. O painel 16E mostra os macrófagos infectados incubados com as micropartículas contendo crotamina. Foi possível observar que a quantidade de micropartículas controle dentro dos macrófagos é inferior à quantidade de micropartículas contendo crotamina, o que corrobora os resultados de contagem obtidos na Figura 15. A crotamina em solução não foi tóxica para os macrófagos infectados, bem como, para as amastigotas, visto que as células permaneceram intactas, como pode ser observado no painel 16F.

**Figura 16. Fotomicrografias representativas de macrófagos peritoneais infectados experimentalmente com *L. amazonensis* e incubados com crotamina encapsulada e em solução**



Fotomicrografias do ensaio de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, visualizados em microscopia de campo claro, com aumento de 1000 X. Sendo representados: macrófagos (A), macrófagos infectados (B); macrófagos infectados incubados com Pentamidina (C); macrófagos infectados incubados com micropartículas sem incorporação de crotamina (D); macrófagos infectados incubados com micropartículas contendo crotamina (E) e macrófagos infectados incubados com crotamina em solução (F). As setas brancas mostram as partículas no citoplasma celular e as pretas mostram as amastigotas no interior das células. Tempo de incubação de 24 horas.

## 5. DISCUSSÃO

Animais peçonhentos, tais como serpentes e escorpiões, apresentam uma variabilidade de moléculas bioativas na composição de seus venenos, como neurotoxinas, miotoxinas, peptídeos, fosfolipases, L-aminoácido-oxidase (LAO), dentre outras. Devido a essa diversidade de moléculas, vários trabalhos têm mostrado que estas apresentam potencial atividade antiparasitária. Borges e colaboradores, (2006) demonstraram o efeito leishmanicida do veneno do escorpião *Tityus discrepans*, que induziu várias modificações estruturais em formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* em baixas concentrações. Fernandez-Gomez e colaboradores, (1994) observaram o efeito do veneno de *Cerastes cerastes* (cascavel de chifres) nas taxas de crescimento de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani*.

Nesse estudo, a atividade antileishmania do veneno de *C.d.terrificus* foi avaliada apenas com as formas promastigotas, pelo método colorimétrico de MTT. Esse método avalia o metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória das células (*Leishmania spp.*) em um único tempo. Na Figura 2, a concentração de 3,12 µg/mL de veneno apresentou a maior inibição (29%), sendo maior que a observada para a pentamidina (23%), utilizada como controle positivo.

Fernandez-Gomez e colaboradores (1994) e Borges e colaboradores (2006), acreditam que alterações ultraestruturais causadas nos parasitas por esses venenos envolvem inchaço e desorganização do cinetoplasto, intensa vacuolização citoplasmática e alargamento da bolsa flagelar. Estes autores sugerem ainda que os venenos podem afetar a cadeia respiratória através de esgotamento de ATP em promastigotas e, portanto, estas organelas seriam as primeiras a sofrer com o tratamento. Passero e colaboradores (2007), relataram a atividade de venenos crotálicos contra parasitas de *L. amazonensis*. Os autores estudaram a atividade antileishmania de três subespécies do gênero *Crotalus*: *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*, bem como suas frações (crotamina, crotoxina, convulxina e giroxina). Com exceção do veneno de *C. d. collilineatus*, os demais venenos (e suas frações) inibiram o crescimento de *L.amazonensis*. Contudo, apenas as frações de *C. d. cascavella* foram testadas contra as formas promastigotas deste parasita.

Neste contexto, os resultados deste trabalho mostraram que a concentração de crotamina responsável pela maior inibição de *L.amazonensis* foi a de 6,25 µg/mL, inibindo 18% dos parasitas. A concentração de crotoxina com o efeito antileishmania mais evidente foi a de 50 µg/mL, que inibiu 28% das promastigotas.

As toxinas crotamina e crotoxina (fracionadas do veneno de *C. d. cascavella*) foram testadas contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* por Passero e colaboradores (2007). No qual as promastigotas foram incubadas com essas toxinas durante 72 h e após esse período os parasitas vivos foram contados pelo método de contagem direta. O autor afirma que a Inibição de Crescimento de 50% (IC<sub>50</sub>) de crotamina foi de 19,9 µg/mL. A crotoxina apresentou um IC<sub>50</sub> consideravelmente superior: 99,8 µg/mL. Contudo, quando as células ficam incubadas durante mais de 48 h, elas podem ficar mais suscetíveis à morte celular, pela ausência de nutrientes em decorrência da própria metabolização do meio de cultura, o que poderia facilitar ou induzir involuntariamente a morte das células.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, não foi possível calcular o IC<sub>50</sub> porque as toxinas testadas não apresentaram efeito concentração-dependente. Além disso, tanto a crotamina quanto a crotoxina tiveram uma baixa atividade tóxica contra *L. amazonensis*. Vale ressaltar que por serem ensaios preliminares em busca da toxina que tivesse o melhor comportamento para ser encapsulada em um sistema de liberação modificada de drogas, essa atividade foi verificada em apenas 24 h, diferentemente do trabalho realizado por Passero e colaboradores (2007).

A toxina selecionada para ser encapsulada em sistema de liberação modificada de drogas foi a crotamina, uma vez que apresentou boa interação com proteínas do extrato bruto de *L. amazonensis*, bem como com as próprias micropartículas de PLGA, parâmetros analisados pela técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS). Essa elevada interação da crotamina, tanto com extrato proteico do parasita, quanto com o polímero PLGA pode ter influenciado nos ensaios de captura das partículas pelos macrófagos murinos. Segundo Kerkis e colaboradores (2004), a crotamina é naturalmente um Peptídeo Célula Penetrante (PPC), logo, a incorporação desta em um sistema de liberação de drogas pode potencializar sua propriedade de penetração, além de possibilitar liberação gradativa da toxina no interior da célula alvo, quando as micropartículas forem capturadas pelos macrófagos.

O sistema de liberação modificada de fármacos utilizado neste estudo consiste na incorporação da molécula bioativa (toxina) em copolímeros de PLGA (Ácido Poli Lático co-Glicólico). A escala selecionada foi a micrométrica, na qual um lote de micropartículas controle, ou seja, sem incorporação de qualquer molécula foi feito num primeiro momento e, posteriormente, um segundo lote foi produzido, aquele contendo crotamina microencapsulada. O diâmetro obtido a partir da caracterização desses lotes foi de 1,31 µm para micropartículas controle e 3,09 µm para micropartículas contendo crotamina. O diâmetro e a incorporação de

bioativos nessas micropartículas são importantes para se obter um direcionamento na célula alvo e maior eficácia da molécula incorporada. Segundo Eldridge e colaboradores (1991), O'hagan e colaboradores (1993) e Nicolette e colaboradores (2008), as potencialidades para o uso desses sistemas são devido à proteção do composto a ser administrado, possibilitando redução na quantidade utilizada, aumento da estabilidade dos mesmos *in vitro* e *in vivo* e interação com células do Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), uma vez que partículas com diâmetro inferior a 10 µm são fagocitadas de maneira eficiente por macrófagos, o que pode contribuir para o desencadeamento e/ou modulação das respostas imune inata ou adquirida.

Após a produção das micropartículas, a taxa de encapsulação de crotamina nos copolímeros foi estimada. Inicialmente foi proposto que 4 mg/mL de crotamina fosse encapsulado em 100 mg de PLGA. Contudo, apenas 0,13 mg foi encapsulado, ou seja, a taxa de encapsulação foi de 32,5%. Apesar de ter havido uma perda considerável, a concentração encapsulada é maior que o IC<sub>50</sub> da crotamina de *C. d. cascavella*, obtido por Passero e colaboradores (2007). Além disso, as micropartículas contendo uma concentração menor de crotamina (que é uma miotoxina) proporciona mais segurança para a administração *in vivo* da toxina encapsulada.

Os primeiros testes biológicos realizados com as micropartículas foram para avaliar a atividade antileishmania (em formas promastigotas) da crotamina encapsulada após 24 e 48 h de incubação. As micropartículas contendo crotamina tiveram praticamente o mesmo efeito antileishmania nos dois períodos de tempo. Alguns trabalhos têm investigado as atividades biológicas de crotamina encapsulada (como endocitose e terapia anticâncer), porém, ainda não foi descrita nenhuma atividade antileishmania de crotamina incorporada em micropartículas de PLGA. Nesse aspecto esse trabalho é pioneiro e inovador.

As células-alvo utilizadas foram os macrófagos peritoneais de camundongos de linhagem BALB/C, pois estas células fagocitam as formas promastigotas que se diferenciam em amastigotas no fagolisossomo das mesmas. Por essa razão, foi fundamental avaliar a citotoxicidade da crotamina em solução e incorporada em micropartículas sobre estas células. Foi observado que tanto a crotamina em solução quanto encapsulada não apresentaram toxicidade contra macrófagos peritoneais, após 24 h de incubação. Passero e colaboradores (2007) verificaram que o veneno bruto de *C. d. cascavella*, bem como, crotamina, não apresentaram efeitos tóxicos contra macrófagos da linhagem J774, após este mesmo período, corroborando os resultados obtidos nesse trabalho.

No ensaio de captura das micropartículas por macrófagos peritoneais murinos, a quantidade de micropartículas capturadas contendo crotamina foi superior a de micropartículas controle e o Índice Fagocítico teve o mesmo comportamento. Hayashi e colaboradores (2008) verificaram que as células CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*), quando incubadas com baixas concentrações de crotamina em solução, internalizavam crotamina por endocitose. Tal fato, corrobora o aumento da fagocitose e do Índice Fagocítico dos macrófagos murinos, quando estes foram incubados com a crotamina incorporada em micropartículas.

No contexto dos mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos ativados, a citocina TNF- $\alpha$  é um produto importante para a manutenção da atividade microbicida nestas células. Em ensaios *in vitro* os macrófagos podem ser ativados pelo processo de fagocitose e produzem citocinas como TNF- $\alpha$ . Esta é capaz de modular a resposta imune inata mediada por células, aumentando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) para a produção do gás Óxido Nítrico (NO), uma molécula pequena, porém responsável por um eficiente mecanismo microbicida, dentre outros efeitos.

Diante desse cenário, os sobrenadantes das amostras do ensaio de fagocitose das micropartículas foram coletados e armazenados, para que fosse possível investigar se os macrófagos haviam sido ativados após a captura das micropartículas. E foi observado que as micropartículas contendo crotamina encapsulada, bem como a toxina em solução foram capazes de produzir níveis elevados desta citocina.

Cruz e colaboradores (2005) incubaram macrófagos peritoneais com 10  $\mu\text{g/mL}$  de veneno de *C. d. terrificus* e observaram nestas células grandes vacúolos, projeções de membrana, integridade da membrana plasmática e perfis de mitocôndrias bem preservados, características de boa viabilidade celular. Isso pode explicar a viabilidade de macrófagos observados no ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT citado anteriormente, pois o mesmo avalia atividade do metabolismo mitocondrial da célula.

No que se refere ao ensaio de fagocitose e dosagem de TNF- $\alpha$ , estes autores também sugeriram que o aumento do número de vacúolos durante a estimulação com o veneno foi, provavelmente, devido ao aumento da exocitose das proteínas inflamatórias, o que poderia ser detectado nos sobrenadantes das culturas estimuladas. Além disso, os autores verificaram que a exposição dos macrófagos ao veneno de *C. d. terrificus* aumentou a produção de TNF- $\alpha$ . Esses fatos corroboram os resultados obtidos nesse estudo, uma vez que foi verificado aumento dos níveis desta citocina quando os macrófagos foram incubados com crotamina

encapsulada e também em solução. Vale ressaltar que os níveis de TNF- $\alpha$  detectados na amostra contendo crotamina em solução foram superiores aos observados para a crotamina encapsulada. Isso sugere que a ativação desencadeada pela crotamina em solução gera uma resposta exacerbada nos macrófagos, o que poderia levar ao extravasamento de outros mediadores inflamatórios na matriz extracelular, causando dano tecidual. Isso justifica a importância de se encapsular a crotamina, pois uma vez incorporada no sistema microparticulado, a crotamina é liberada gradativamente no interior da célula, minimizando os riscos de exacerbação da resposta e aumentando a segurança para a administração *in vivo*.

Segundo Pereira (2011), os peptídeos que apresentam capacidade de se translocar em membranas celulares e entrar nas células são chamados Peptídeos Célula Penetrante (PPC). Esses PPCs variam em relação ao tamanho da sequência de aminoácidos e da carga de superfície, que geralmente incluem sequências curtas e catiônicas ou anfipáticas, ricas em resíduos de aminoácidos básicos, tais como, arginina e lisina. Na maioria dos casos, os PPCs contêm um domínio de translocação de membrana e/ou uma sequência de compartimentalização celular ou ambos.

O fato da crotamina ser classificada como um PPC e poder interagir com as estruturas intracelulares de forma mais acentuada explica os resultados observados nesse trabalho, nos quais, macrófagos contendo crotamina encapsulada e em solução apresentaram um Índice Fagocítico superior ao observado para as micropartículas controle. Isso sugere que mesmo em baixa concentração de crotamina – foi estimada concentração de liberação intracelular das partículas como sendo entre 50 e 60 pg/mL – a propriedade célula penetrante de crotamina foi mantida, sendo capaz de promover os eventos intracelulares observados, aumentando a fagocitose e os níveis da citocina TNF- $\alpha$ .

Neste cenário, Cruz e colaboradores (2005) verificaram que partículas internalizadas por macrófagos e outras células fagocíticas na presença do veneno de *C. d. terrificus* levaram à geração de vacúolos fagocíticos. Uma típica característica de tais vacúolos é seu amadurecimento progressivo ao longo da via endocítica, levando à fusão com endossomos e em última instância, com os lisossomos, onde o material ingerido é degradado. Além disso, os autores observaram a presença de vacúolos após exposição a 10  $\mu$ g/mL do veneno. Nesse trabalho, o resultado obtido no experimento com a crotamina encapsulada sobre as formas amastigotas mostrou que a inibição dessas formas foi superior à de amastigotas incubadas com a crotamina em solução. Tal fato sugere que as micropartículas contendo crotamina, quando capturadas, ativam os mecanismos microbicidas de macrófagos, que por sua vez

produzem mediadores inflamatórios, como por exemplo, o TNF- $\alpha$ , que induz a produção de óxido nítrico, o que promove o fenômeno denominado “burst oxidativo” e consequentemente, a resolução da infecção.

Os fenômenos celulares observados mediante exposição dos macrófagos às preparações contendo crotamina sugerem que apesar da crotamina encapsulada e em solução não terem apresentado significativa redução no processo de morte das formas amastigotas intracelulares, por outro lado, promoveram de forma significativa a ativação macrófagos, induzindo a produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , essencial para a manutenção dos mecanismos microbicidas dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Segundo Vieira e colaboradores (2006) a crotamina é uma neuro e miotoxina, o quadro clínico mais evidente e característico por ela induzido é a intensa paralisia flácida dos membros posteriores em aproximadamente 10 min quando administrada por via intraperitoneal (20 $\mu$ g/25g) e menos de 1 min quando administrada por via intravenosa (5 $\mu$ g/25g). Os autores também verificaram que vários fármacos, inclusive aqueles descritos como antagonistas de crotamina em diafragma isolado de rato não foram eficientes em reverter seu efeito *in vivo*.

Os resultados aqui obtidos reforçam a importância da segurança na administração *in vivo* dessa toxina, especialmente quando incorporada em um sistema de liberação modificada de fármacos. Esse sistema microparticulado pode direcionar a crotamina às células e seus compartimentos alvo, por exemplo, os macrófagos e os fagolisossomos, sendo liberada gradativamente no ambiente intracelular, favorecendo os mecanismos microbicidas para o controle da replicação de *L. amazonensis*. Tal abordagem permitirá estudos futuros envolvendo o emprego da crotamina encapsulada associada a fármacos utilizados na quimioterapia da leishmaniose cutânea como terapia alternativa ou complementar da infecção.



## 6. CONCLUSÃO

O veneno bruto de *C. d. terrificus* e as toxinas crotamina e crotoxina apresentaram baixa atividade antileishmania, avaliada pelo método colorimétrico de MTT.

A fração crotoxina não apresentou afinidade e/ou interação com as proteínas do extrato proteico de *L. amazonensis* e apresentou baixa afinidade pelas micropartículas de PLGA. Por outro lado, a crotamina apresentou afinidade e/ou interação com as proteínas presentes no extrato proteico, além de também apresentar uma elevada interação com o polímero de PLGA.

As micropartículas de PLGA contendo crotamina apresentaram taxa de encapsulação de 32,5%, bem como forma esférica e superfície regular. Além disso, as micropartículas não apresentaram toxicidade contra macrófagos peritoneais murinos.

As micropartículas contendo crotamina apresentaram perfis similares de inibição das formas promastigotas de *L. amazonensis*, tanto em 24 quanto em 48 h.

No ensaio de captura das micropartículas por macrófagos peritoneais, a quantidade de micropartículas contendo crotamina capturada foi superior a de micropartículas controle. O Índice Fagocítico apresentou comportamento semelhante.

As micropartículas contendo crotamina foram capazes de ativar macrófagos, resultando na produção de níveis elevados da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ .

No ensaio de fagocitose de *L. amazonensis*, os macrófagos que capturaram as micropartículas contendo crotamina, não apresentaram uma redução significativa no processo de morte das formas amastigotas.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª ed., 2008.
- ALMEIDA, O.L.S., SANTOS, J.B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, p. 497-506, 2011.
- ANTONELLI, L.R., DUTRA, W.O., ALMEIDA, R.P., BACELLAR, O., GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, 136: 341-348, 2004.
- AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B. Immune response to *Leshmania* infection. **Indian J Med Res**, 119, 2004.
- AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. **Monografia. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas**, 2002.
- BARROS, N.B., MIGLIACCIO, V., FACUNDO, V.A., CIANCAGLINI, P., STÁBELI, R., NICOLETE, R., SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: macrophage as target cell. **Experimental Parasitology**, v. 135., p. 337-343, 2013.
- BASANO, A.S.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, p. 328-337, 2004.
- BERCOVICI, D., CHUDZINSKI, A.M., DIAS, W., ESTEVES, M.I., HIRACHI, E., OISHI, N.Y., PICARELLI, Z.P., ROCHA, M.C., UEDA, C.M.P.M., YAMANOUYE, N., RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, p. 69 – 78, 1987.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, vol 15, 1999.
- BOGDAN, Christian Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. **Current Opinion in Immunology**. 1996.
- BON, C., JANG, T.W. Crotoxin: a possible mechanism of action. **Adv. Cytopharm.**, 231 – 235, 1979.
- BON, C., BOUCHIER, C., CHOUMET, V., FAURE, G., JIANG, M.S., LAMBEZAT, M.P., RADVANY, F., SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam**, v.39, p.439 – 448, 1989.
- BORGES, A., SILVA, S., OPDENCAMP, H.J., VELASCO, E., ALVAREZ, M., ALFONZO, M.J., JORQUERA, A., DE SOUSA, L., DELGADO, O. *In vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. **Parasitology Research**, v. 99, p. 167–173, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p. 248 – 253, 1976.

BRASIL. SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde**, ed. 2. 2007.

BRASIL. SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde**, ed.8. 2010.

BRAZIL, O.V., FONTANA, M.D. Toxin as tools in the study of sodium channels distribution in the muscle fibre membrane. **Toxicon**, v. 31, p.1085–1098, 1993.

BREITHAUPT, H., RUBSAMEN, K., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotopotin and the basic *Crotalus* phospholipase A2. **Eur. J. Biochem**, v. 49, p.333 – 345, 1974.

BREITHAUPT, H. Neurotoxic and miotoxic activities of the *Crotalus* phospholipase A2 and its complex with crotopotin. Naunyn-Schmiedebergs **Arch. Pharmak**, v.292, p.271 – 278, 1976b.

CASTELLANO, L.R.C. Resposta imune antileishmania e mecanismos de evasão. **Academia Biomédica Digital**, v.25, p.1-10, 2005.

CRUZ, A.H., MENDONÇA, R.Z., PETRICEVIC, V.L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 349–359, 2005.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**,72, 2002.

DE OLIVEIRA, CL., BRODSKYN, CL. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v.3, p.145, 2012

DEDET, JP. Protozoan Diseases: Leishmaniasis. **Elsevier Inc.**, v.5, p. 367-370, 2008.

DORLO, T.P.C., BALASEGARAM, M., BEIJNEN, J.H., VRIES, P.F. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 67, p. 2576 – 2597, 2012.

ELDRIDGE, J.H., STAAS, J.K., MEULBROEK, J.A., TICE, TR; GILLEY, RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Molecular Immunology**. v.28, p. 287-294, 1991.

FERNANDEZ-GOMEZ, R., ZERROUK, H., SEBTI, F., LOYENS, M., BENSLIMANE, A., OUAISSI, M.A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, p. 875–882, 1994.

FILHO, A.V.C., LUCAS, Í.C., SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 424-427, 2008

GIAIMIS, J., LOMBARD, Y., MAKAYA-KUMBA, M., FONTENEAU, P., POINDRON, P. A new and method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **J. Immunol.**, v.154, p.185 – 193, 1992.

GOPALAK-RISHNAKONE, P., DEMPSSTER, D.W., HAWGOOD, B.J., ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v.22, p.85 – 98, 1984.

GORAK P.M., ENGWERDA C.R., KAYE P.M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.687-695, 1998.

GORDON, S., UNKELESS, J.C., COHN, Z.A. Induction of macrophage plasminogen activator by indotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two stage process. **Journal of Experimental Medicine**, v. 140, p.995-1010, 1974.

HAYASHI, M.A.F., NASCIMENTO, F.D., KERKIS, A., OLIVEIRA, V., OLIVEIRA, E.B., PEREIRA, A., BAPTISTA, G.R., NADER, H.B., YAMANE, T., KERKIS, I., TERARIOL, I.L.S. Cytotoxic effects of crotoxin are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, p. 508-517, 2008

HENDON, R.A., FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.68, p.1560 – 1563, 1971.

HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxidemediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology, London**, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HONG, S.J., CHANG, C.C. Electrophysiological studies of myotoxin a isolated from prairie rattlesnake ( *Crotalus viridis viridis* ) venom on murine skeletal muscle. **Toxicon**, v.23, p. 927–937, 1985.

KERKIS, A., KERKIS, I., RADIS-BAPTISTA, G., OLIVEIRA, E.B., VIANNA-MORGANTE, A.M., PEREIRA, L.V., YAMANE, T. Crotoxin is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J.**, v.18, p.1407–1409, 2004.

KERKIS, A ., HAYASHI, M.A .F., YAMANE, T., KERKIS, I. Properties of cellpenetrating peptides (CPPs). **IUBMB Life**, v.58, p.7–13, 2006.

KOLOTOVA, E.S., EGOROVA, S.G., RAMONOVA, A.A., BOGORODSLI, S.E., POPOV, V.K., AGAPOV, I.I., KIRPICHNIKOV, M.P. Cytotoxic and Immunochemical Properties of Viscumin Encapsulated in Polylactide Microparticles. **Acta Naturae**. v. 4, p.101-106, 2012.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-5, 1970.

LAWN, S.D., YARDLEY, V., VEGA-LOPEZ, F., WATSON, J., LOCKWOOD, D.N. New World cutaneous leishmaniasis in returned travellers: treatment failures using intravenous sodium stibogluconate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 97, p. 443-445, 2003.

LIMA, E.B., PORTO, C., MOTTA, J.O.C., SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 82, p.111-124, 2007.

MANCIN, A.C., SOARES, A.M., ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., FAÇA, V.M., GREENE, L.J., ZUCCOLOTTO, S., PELÁ, I.R., GIGLIO, J.R. The analgesic active of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v.36, p.1927-1937, 1998.

NADERER T., MCCONVILLE, M, J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective **Cellular Microbiology**, v.10, p.301–308, 2008.

NICOLETE, R., LIMA, K.D.E.M., JÚNIOR, J.M., BARUFFI, M.D., DE MEDEIROS A.I., BENTLEY, M.V., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H. *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B<sub>4</sub>-loaded biodegradable microspheres. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. v.83, p.121-129, 2007.

NICOLETE, R. Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B<sub>4</sub> ou prostaglandina E<sub>2</sub> em modelo de histoplasmose murina. **Tese. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, 2008

NICOLETE, R., SECATTO, A., PEREIRA, P.A., SOARES, E.G., FACCIOLI, L.H. Leukotriene B<sub>4</sub>-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 34, p. 365-369, 2009.

NICOLETE, R., SANTOS, D.F., FACCIOLI, L.H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. **International Immunopharmacology**. v.11, p.1557–1563. 2011.

NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; KUNOU, N.; KAWASHIMA, Y. Preparation of biodegradable nanoparticles of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. **J Control Release**. v.25, p.89 – 98, 1993.

O'HAGAN, D.T., JEFFERY, H., DAVIS, S.S. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. **Vaccine**, v.11. p. 965-969, 1993.

PASSERO, L.F.D., TOMOKANE, T.Y., CORBETT, C.E.P., LAURENTI, M.D., TOYAMA, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* Venoms. **Parasitology Research**. v.101, p.1365-1371, 2007.

PAULA, C.D.R., SAMPAIO, J.H.D., CARDOSO, D.R., SAMPAIO, R.N.R., Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, p. 365-371, 2003.

PEREIRA, A. Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de *Crotalus durissus tefficus* sobre as células indutoras de tumores. **Tese. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, 2011.

QUINTANA, J.C., CHACÓN, A.M., VARGA, L., SEGURA, C., GUTIÉRREZC, J.M., ALARCÓN, J.C. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. **Acta Tropica**. v.124, p.126–132, 2012.

RANGEL-SANTOS, A., DOS-SANTOS, E.C., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C., CARDOSO, D.F., MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**. v. 43, p. 801-810, 2004.

RATH, S., TRIVELIN, A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESUS, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**. v.26, p. 550-555, 2003.

ROGERS, K.A., DEKREY, G.K., MBOW, M.L., GILLESPIE, R.D., BRODSKYN, C.I., TITUS, R.G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**, v.209, p.1–7, 2002.

ROMÃO, P.R.T., DIAS, R.O., CRUZ, K.K., MARQUES, F.C.S., MONTEIRO, M.C.M., Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v.3, n.1, 2007.

ROMERO, A.L., MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opin Drug Delivery**. v. 5, p. 805-823, 2008.

RONET, A., BEVERLEY, S.M., FASEL, N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: The ultimate subversion. **Virulence**. v. 2, p. 547-552, 2011.

RÜBSAMEN, K., BREITHAUPT, H., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of yhe crotoxin complex I. Subfractionation and recombination of yhe crotoxin complex. **Naunyn-Schmie-debergs Arch. Pharmakol.**, v.270, p.274 – 288, 1971.

SAMPAIO, R.N.R., LUCAS, Í.C., FILHO, A.V.C. O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.84,p. 125-128, 2009.

SANTOS, D.O., COUTINHO, C.E., MADEIRA, M.F., BOTTINO, C.G., VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S.B., BERNARDINO, A., BOURGUIGNON, S.C., CORTE-REAL, S., PINHO, R.T., RODRIGUES, C.R., CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**. v.103, p.1-10, 2008.

SINGH, N., KUMAR, M., SINGH, R.K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 5, p. 485-497, 2012.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Braz J Pharm Sci** . v.40, p. 139-149.2004.

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Immunology**. v.3, p.58. 2012.

THIEL, P.P.A.M., GOOL, T., KAGER, P.A., BART, A. First Cases of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (viannia) naiffi* Infection in Surinam. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.82, p.588-590, 2010.

VIEIRA, C.A., VIEIRA, L.O., BUENO, J.J.R., DEBIASI, M.R.M., MANCINI, A.C., GIGLIO, J.R. Ação de vários agentes sobre o efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela crotamina em camundongos. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 125-132, 2006.

VILOS, C., VELASQUEZ, L.A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2012, p. 9, 2012

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dados epidemiológicos atualizados. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acessado em 21 de maio de 2013

# **Anexos**



## ANEXO A



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2012/6 registrado sob no 2012/6 na folha 11 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade do Dr. Roberto Nicolete coordenador do projeto intitulado: **“Micro/nanopartículas biodegradáveis funcionalizadas com toxinas animais: caracterização e aplicação no tratamento da leishmania cutânea”**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 16 de outubro de 2012.

Porto Velho, 16 de outubro de 2012.

#### Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

-Ms. Luiz Herman Soares Gil

## ANEXO B

# Semana Nacional de Ciência e Tecnologia

Edição 2012



## CERTIFICADO

Certificamos que Sharon Rose Aragão Macedo  
participou do(a) I Encontro de Estudantes de Pós-Graduação em Saúde  
com carga horária de oito horas, realizado(o) em  
19 / outubro de 2012, por ocasião da IX Semana Nacional de  
Ciência e Tecnologia.

  
Dr. Rodrigo Guerino Stábili  
Diretor PRO96/2009  
Fiocruz Rondônia





## ANEXO C



**Worldleish 5**  
Fifth World Congress on Leishmaniasis  
Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil,  
May 13th to 17th 2013

## CERTIFICATE

We hereby certify that **SHARON ROSE ARAGÃO MACEDO; AMÁLIA DOS SANTOS FERREIRA; NEUZA BIGUINATI DE BARROS; ROBERTO NICOLETE** participated in the **FIFTH WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS - WORLDLEISH 5** - by presenting the work entitled **BIODEGRADABLE MICROPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH ANIMAL TOXINS: CHARACTERIZATION AND POTENTIAL APPLICATION IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS** in the **POSTER** sessions - convened from 13th to May 17th, 2013, at Porto de Galinhas, PE, Brazil.

  
Sival P. Brandão Filho

  
Carlos H. N. Costa

  
Claude Pirmez

  
Jeffrey J. Shaw

Promoters



## ANEXO D



**XVIII International  
Congress for Tropical  
Medicine and Malaria**

and

**XLVIII Congress of  
the Brazilian Society  
of Tropical Medicine**

XXVIII Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Chagas Disease, XVI Brazilian Annual Meeting of Applied Research on Leishmaniasis and  
III Latin American Congress on Travel Medicine

### *Certificate*

Cantanhede, LM; Silva-Júnior, CF; Ito, MM; Custódio, MGF; Alves, PH; Aragão-Macedo, SR;  
This is to certify that Nicolete, R; Salcedo, JMV; Garrido, LM; Pescarini, JM; Krieger, H; Ferreira, RGM  
has attended the XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII  
Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, held in Rio de Janeiro from September 23 to 27,  
2012, as Poster Presentation: Detection of the Leishmanivirus in patients with cutaneous and  
mucocutaneous leishmaniasis in Rondonia, Western Amazonian region

Rio de Janeiro, September 27, 2012.

Professor Pierre Ambroise-Thomas  
President of the ICTM

Professor José Rodrigues Coura  
President of the XVIII ICTMM

Professor Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro  
President of the Scientific Committee of the XVIII ICTMM

Professor Carlos Henrique Nery Costa  
President of the SBMT

## ANEXO E



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Fiocruz Rondônia



Certificamos que **Sharon Rose Macedo**  
apresentou o trabalho **Biodegradable microparticles functionalized with  
crotamine isolated from Crotalus durissus terrificus as experimental  
therapy in cutaneous leishmaniasis** durante a realização do I Simpósio de  
Nanobiotecnologia de Rondônia e do II Encontro de Pós-Graduação em  
Saúde de Rondônia, realizado no período de 22 a 25 de outubro.

Porto Velho, 25 de outubro de 2013.

Andreimar Martins Soares  
Coordenador da Comissão Organizadora

Carla Freire Celedônio Fernandes  
Vice-diretora de Ensino, Comunicação  
e Informação - Fiocruz Rondônia

Apoio:

